



Synthèse de nanoparticules mésoporeuses de silice et encapsulation du cisplatine en vue du ciblage des traitements de chimiothérapie anticancéreuse

Mathieu Varache

► To cite this version:

Mathieu Varache. Synthèse de nanoparticules mésoporeuses de silice et encapsulation du cisplatine en vue du ciblage des traitements de chimiothérapie anticancéreuse. Cancer. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS007 . tel-01287626

HAL Id: tel-01287626

<https://theses.hal.science/tel-01287626>

Submitted on 15 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
LABORATOIRE INTERDISCIPLINAIRE CARNOT DE BOURGOGNE
UMR 6303 CNRS/UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
ECOLE DOCTORALE CARNOT-PASTEUR

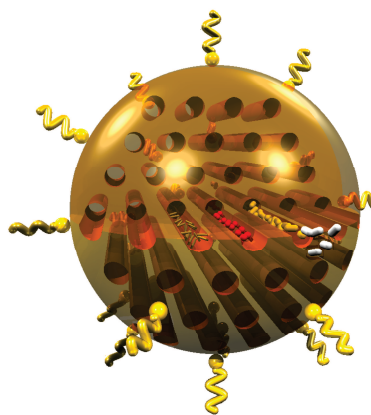
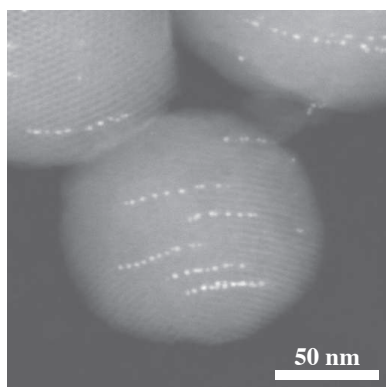
THÈSE

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
DISCIPLINE SCIENCES, SPÉCIALITÉ CHIMIE-PHYSIQUE

PAR

MATHIEU VARACHE

**SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES MÉSOPOREUSES DE SILICE ET
ENCAPSULATION DU CISPLATINE EN VUE DU CIBLAGE DES
TRAITEMENTS DE CHIMIOTHÉRAPIE ANTICANCÉREUSE**



Soutenue le 13 mars 2014 à Dijon, devant la commission d'examen suivante :

E. LESNIEWSKA	Professeur à l'Université de Bourgogne, ICB	<i>Président</i>
H. HOFMANN	Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, LTP	<i>Rapporteur</i>
B. LEBEAU	Directeur de Recherche CNRS, IS2M	<i>Rapporteur</i>
Fl. BOUYER	Maître de Conférence à l'Université de Bourgogne, INSERM	<i>Examineur</i>
B. CHAUFFERT	Professeur d'Oncologie Médicale, CHU d'Amiens	<i>Examineur</i>
M.-H. DELVILLE	Directeur de Recherche CNRS, ICMCB	<i>Examineur</i>
I. BEZVERKHYY	Chargé de Recherche CNRS, ICB	<i>Invité</i>
F. BARAS	Chargé de Recherche CNRS, ICB	<i>Directeur</i>
F. BOUYER	Maître de Conférence à l'Université de Bourgogne, ICB	<i>Co-encadrant</i>

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'équipe « Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'Interface (MaNaPI) du département Nanosciences du laboratoire Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne (ICB) en collaboration avec l'équipe « Chimiothérapie, métabolisme des lipides et réponse immunitaire antitumorale » de l'INSERM U866 de Dijon. Ces travaux ont été rendus possibles grâce au soutien financier du Conseil Régional de Bourgogne et de l'Université de Dijon.

Je tiens tout d'abord à remercier les Professeurs Gilles Bertrand et Alain Dereux, ancien et actuel directeurs du laboratoire ICB pour m'avoir ouvert les portes de ce laboratoire.

J'adresse également mes remerciements au Professeur Frédéric Bernard pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe MaNaPI et de m'avoir donné les moyens nécessaires au bon déroulement de ce travail de thèse. Je le remercie pour son dynamisme communicatif qui est essentiel à l'animation de cette équipe.

Mes plus sincères remerciements vont au Directeur de Recherche Bénédicte Lebeau-Talamona de l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse et au Professeur Heinrich Hofmann de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

J'exprime ma profonde gratitude au Directeur de Recherche Marie-Hélène Delville ainsi qu'aux Professeurs Eric Lesniewska et Bruno Chauffert pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de m'avoir prodigué de précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

S'il y a bien trois personnes que je ne remercierai jamais assez tant ils m'ont apporté durant ces années, ce sont mes encadrants de thèse officiels et officieux.

Merci à Monsieur Frédéric Bouyer, Maître de Conférence à l'Université de Bourgogne de m'avoir fait découvrir le monde passionnant de la recherche lors de mon stage de Master 1, il y a maintenant cinq ans, et ensuite pour m'avoir proposé ce sujet de thèse. Vous avez dès le début cru en mes capacités et m'avez soutenu sans faille durant toutes ces années. Votre enthousiasme, votre pédagogie, votre honnêteté, votre esprit critique, votre ouverture d'esprit, votre volonté d'être toujours dans le vrai et votre investissement total sont autant de qualités que j'ai fortement appréciées. Je vous serai toujours reconnaissant de m'avoir donné goût à la recherche. Une question me taraude malgré tout à savoir, à quand le tutoiement ?

Merci également à Monsieur Igor Bezverkhyy, Chargé de Recherche au laboratoire ICB

d'avoir participé avec tant de ferveur à ces travaux de thèse. Ta culture scientifique nous a permis d'enrichir considérablement ce projet et les débats qu'il comprenait. Je ne te remercierai jamais assez pour tes encouragements, tes très bons conseils, ta disponibilité, ta confiance et ton intérêt pour les investigations scientifiques poussées. Un grand merci pour ces nombreuses heures passées à travailler pour ce projet.

Un grand merci à Madame Florence Baras, Chargé de Recherche au laboratoire ICB d'avoir dirigé cette thèse. Je te serai toujours reconnaissant pour ta patience, ton ouverture d'esprit et ta sagesse, malgré une thématique de recherche quelque peu éloignée de la tienne. Un grand merci également de m'avoir donné l'opportunité de transmettre aux plus jeunes notre goût pour la science.

Merci à vous trois d'avoir été présents tous les jours et à toute heure. Ce fut trois excellentes années passées à vos côtés. Vos qualités professionnelles et humaines ont été complémentaires et cela m'a permis de m'améliorer chaque jour.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame Florence Bouyer, Maître de Conférence à l'Université de Bourgogne pour m'avoir encadré lors des tests de cytotoxicité et d'avoir accepté de faire partie du jury de soutenance de ce travail. Un grand merci également pour votre investissement, vos relectures et suggestions de corrections.

Un très grand merci à Monsieur Lucien Saviot, Directeur de Recherche au laboratoire ICB de m'avoir accueilli dans son bureau pendant toutes ces années et de m'avoir permis de caractériser les nanoparticules par spectroscopie Raman. Je ne saurai te dire à quel point je te suis reconnaissant. Merci pour ton aide en toute circonstance, que ce soit pour la programmation (Latex, POV-Ray), pour la science (je ne peux tout citer) ou pour la détente (Le Gorafi entre autres). Merci également d'avoir toujours répondu judicieusement à mes questions incessantes !

Je remercie également Messieurs Pierre Legendre et Ewen Bodio de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB) avec qui j'ai eu la chance de collaborer. J'espère que le projet que nous avons mis en place trouvera le chemin de la réussite. J'exprime ma reconnaissance envers Monsieur Marcel Soustelle de l'ICMUB pour les analyses élémentaires ainsi que Monsieur Philippe Gaveau de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICG) pour les analyses en RMN du solide.

Un remerciement particulier à Monsieur Guy Weber, Chargé de Recherche au laboratoire ICB de m'avoir donné la possibilité de caractériser les nanoparticules fonctionnalisées par spectroscopie FTIR. Un grand merci pour nos longues discussions, quelles qu'elles soient.

Je souhaite également remercier un ami avec qui j'ai pu collaborer, Monsieur Michel Moussus du CEA-Leti, afin de caractériser l'internalisation des nanoparticules par microscopie confocale.

Merci également aux membres du service analyses-instrumentation, au centre de ressources mécaniques et au service informatique et électronique du laboratoire ICB pour leurs aides tant techniques qu'humaines qu'ils ont apportées durant ce projet. Je souhaiterais particulièrement remercier Rémi Chassagnon, Nicolas Geoffroy, Olivier Heintz et Frédéric Herbst pour leur disponibilité sans faille et pour les bons moments passés ensemble. J'exprime toute mon amitié à

tous les membres du laboratoire ICB, chercheurs, personnels techniques ou administratifs, pour leur aide et leur sympathie. Un remerciement spécial à Coralie Fevre pour son aide administrative et sa bonne humeur. Merci aussi à Anne-Marie Sombstay pour sa spontanéité. Je remercie également très vivement toutes les personnes du laboratoire que je n'ai pas citées, qui de près ou de loin, se sont intéressés ou ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier tous les étudiants que j'ai pu avoir en travaux pratiques/dirigés ainsi que tous les étudiants que j'ai pu encadrés au cours de mon doctorat : Etienne Ciernak, Manuela Aoukar, Ulrich Legrand, Amélie Cot, Romane Sarrazin et Alexandre Royer. Un remerciement particulier à Florent Crevat pour avoir contribué de manière indéniable à ces travaux de thèse. Je reste convaincu que tu mèneras très bien la suite de ce projet et que ta thèse sera excellente ! En revanche, n'oublie pas de me prévenir de ta date de soutenance pour que je puisse en juger par moi-même... Merci également pour ton humour qui se rapproche un peu du mien...

Puisque la recherche implique de manière indéniable un travail en équipe, je souhaite remercier tous les membres de l'équipe MaNaPI pour les nombreux échanges que nous avons eus lors des pauses-café, pour leurs encouragements ainsi que pour leur aide en toute circonstance. Je remercie donc Olivier Bidault, Jean-Claude Niepce, Elisabeth Sciora, Isabelle Gallet, Frédéric Demoisson, Moustapha Ariane et Foad Naomi. Mes remerciements vont aussi à Sophie Le Gallet avec qui j'ai eu la chance de partager des enseignements, et à Julien Boudon pour m'avoir beaucoup appris au laboratoire. Un grand merci à vous deux pour toutes vos contributions au bien-être de la communauté. Je tiens également à remercier Nadine Millot pour son dynamisme afin que la thématique NanoBIO de l'équipe puisse vivre convenablement.

Un grand merci aux jeunes docteurs que j'ai eu le plaisir de côtoyer : Antoine Leybros, Sébastien Paris, Julien Pansiot, Lionel Maurizi, Anne-Laure Papa, Anthony Ballandras, Vanessa Bellat, Cédric Morin, Caroline Marlot, Christophe Harder et Antoine Marion.

Je tiens à remercier la Blonde Piquante de MaNaPI qui saura se reconnaître et qui participe à sa façon à la vie de l'équipe. Tu visites Paris ? Je te souhaite de belles choses dans la vie, tu le mérites !

Je remercie Romain Piolet en tant que conscrit de la thèse pour son soutien lors des longues soirées de rédaction mais aussi pour sa passion pour le cinéma d'auteur.

Merci également à mon autre conscrit de thèse, Jérémy Paris d'avoir partagé ces belles années de thèse ainsi que pour les nombreuses parties de badminton. Tu as encore du boulot avant de me battre ! Je vous souhaite à tous les deux une très belle réussite dans vos projets futurs.

Spéciale dédicace aux futurs docteurs qui découvriront petit à petit les nombreuses pièces du navire dans lequel ils ont embarqué : Roy Roukos pour son enthousiasme légendaire, Clémentine Madec pour sa sympathie, Jordan Guichard pour sa discrétion, Romaric Collet pour son initiation aux plaisirs de la natation ainsi que pour sa joie de vivre et Emmanuel Autissier pour m'avoir fait partager sa passion pour les séries.

J'adresse également une pensée à tous les stagiaires qui ont séjourné dans les locaux de

Remerciements

MaNaPI : Thomas, Coralie, Alexis, Olivier, Sylvain et Cédric.

Mes derniers remerciements iront à ma famille, à ma belle-famille et à mes amis pour leur soutien quotidien et leurs encouragements. J'ai été très heureux et touché de partager ce jour particulier en votre présence. Encore une fois, merci à tous d'avoir participé, de près ou de loin, à cette journée. Un remerciement spécial à ma grand-mère, Gisèle Vassard d'avoir été présente ce jour-là. Merci à mes parents d'être toujours présents et disponibles pour moi.

Spéciales dédicaces à toute la team de Bleury, à la JDT family et à RACONT'MWA. Il existe dans la vie des amitiés précieuses !

Un remerciement particulier à mon amie, Flore Laforest pour m'avoir soutenu jusqu'au bout. Merci pour tout ce que tu m'apportes et ce que tu m'apporteras jour après jour. Désormais, l'avenir nous appartient !

Table des matières

Remerciements	iii
Liste des abréviations	xiii
Introduction	1
1 Contexte de l'étude	7
1.1 Les matériaux aux tensioactifs structurants	7
1.1.1 Les matériaux mésoporeux siliciques	7
1.1.2 Comportement des tensioactifs en solution	9
1.1.3 Elaboration de matériaux siliciques par voie sol-gel	11
1.1.4 Elaboration des matériaux mésoporeux de la famille M41S	13
1.2 Etat de l'art sur les différentes voies de synthèse des MSNs	17
1.3 Modification de surface des MSNs	25
1.3.1 Propriétés de surface des MSNs	25
1.3.2 Greffage post-synthèse	27
1.3.3 Fonctionnalisation <i>in situ</i> par co-condensation	28
1.3.4 Fonctionnalisation par des organosilanes bis- et multi-silylés : synthèse d'organosilicates mésoporeux périodiques (PMOs)	29
1.4 Greffage de polymères à la surface des MSNs : stabilité colloïdale en milieu physiologique	30
1.4.1 Stabilité colloïdale : théorie DLVO	31
1.4.2 Origines des charges de surface des nanoparticules de silice	33
1.4.3 Stabilisation par voie électrostatique	36
1.4.4 Stabilisation par voie stérique	36
1.4.5 Stabilisation par voie électro-stérique	37
1.5 Vectorisation du cisplatine	37
1.5.1 Généralités sur la vectorisation	38
1.5.1.1 Les différents systèmes de vectorisation existants	38
1.5.1.2 Les principes du ciblage tumoral	39

1.5.1.3	L'influence des propriétés physico-chimiques des nano-objets sur leur devenir en milieu biologique	40
1.5.1.4	Les différentes générations de vecteurs	42
1.5.2	Vers un nouveau système de vectorisation du cisplatine	43
1.5.3	Généralités sur le cisplatine	45
1.5.3.1	La découverte du cisplatine	45
1.5.3.2	Pharmacologie cellulaire et mécanisme d'action du cisplatine . .	45
1.5.4	Les problèmes liés au cisplatine	47
1.5.5	Les systèmes organiques de vectorisation du cisplatine	48
1.5.5.1	Les liposomes	49
1.5.5.2	Les micelles polymériques	49
1.5.5.3	Les nanoparticules de copolymère (PLGA-PEG)	50
1.5.5.4	Les nanocapsules	51
1.5.6	État de l'art sur la vectorisation du cisplatine par les MSNs	52
1.6	Conclusion	53
2	Synthèse et cytotoxicité <i>in vitro</i> des nanoparticules mésoporeuses de silice	55
2.1	Influence des conditions opératoires de synthèse sur les propriétés morphologiques et structurales des MSNs	55
2.1.1	Protocole « standard » issu de la méthode de Cai <i>et al.</i>	56
2.1.1.1	Réactifs utilisés	56
2.1.1.2	Procédure expérimentale	56
2.1.2	Influence de la concentration en NaOH initial $[\text{NaOH}]_i$	56
2.1.2.1	Conditions opératoires et techniques de caractérisations	56
2.1.2.2	Propriétés morphologiques des matériaux obtenus	58
2.1.2.3	Propriétés structurales des matériaux obtenus	61
2.1.2.4	Propriétés texturales des matériaux obtenus	63
2.1.2.5	Corrélation entre degré de condensation et taux de contraction du réseau	66
2.1.2.6	Évolution du rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$	68
2.1.2.7	Discussion	70
2.1.3	Influence de la température de synthèse	72
2.1.4	Influence de la vitesse d'agitation	73
2.1.5	Influence du mode d'extraction de l'agent tensioactif	77
2.1.5.1	Etude bibliographique sur les méthodes de libération de la porosité	77
2.1.5.2	Démarche expérimentale	78
2.1.5.3	Détermination du pourcentage de CTAB restant par spectroscopie Raman	78
2.1.5.4	Propriétés physico-chimiques des MSNs après extraction	81

2.1.6	Influence du mode de conservation des MSNs	83
2.1.6.1	Mise en évidence de l'effet de l'humidité de l'air sur les propriétés structurales et texturales des MSNs	83
2.1.6.2	Influence de la lyophilisation sur les propriétés structurales des MSNs	86
2.2	Stabilité colloïdale et structurale des MSNs	88
2.2.1	Rappels et hypothèses	88
2.2.2	Démarche expérimentale	90
2.2.3	Dosage par spectroscopie Raman de l'éthanol contenu dans les surnageants	92
2.2.4	Dosage par spectroscopie Raman des carbonates présents dans une solution de soude « vieillie »	93
2.2.5	Propriétés morphologiques des matériaux obtenus	95
2.2.6	Discussion à propos de l'effet de la présence des carbonates et de l'éthanol	97
2.2.7	Propriétés physico-chimiques des MSNs obtenues pour une synthèse réali- sée sous N ₂ et dans les conditions « standards »	98
2.2.8	Stabilité structurale en milieu aqueux des MSNs synthétisées avec ou sans flux de N ₂	100
2.2.9	Renforcement structural des MSNs	102
2.2.9.1	Démarche expérimentale de renforcement structural	103
2.2.9.2	Propriétés morphologiques et structurales des MSNs après ren- forcement de la structure silicique	104
2.2.10	Stabilité structurale en milieu aqueux des MSNs synthétisées avec un flux de N ₂ et renforcées à pH 7,5	106
2.2.11	Dispersion des MSNs après extraction	107
2.3	Comportement des MSNs en présence de cellules en culture	109
2.3.1	Conditions de culture cellulaire	109
2.3.2	Préparation des échantillons	109
2.3.3	Test de cytotoxicité	110
2.3.4	Coloration au crystal violet	110
2.3.5	Expression des résultats	110
2.3.6	Résultats et Discussion	111
2.4	Conclusion sur la synthèse et la cytotoxicité des MSNs	112
3	Synthèse, cytotoxicité <i>in vitro</i> et internalisation des nanoparticules mésopo- reuses de silice fonctionnalisées	115
3.1	Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation	115
3.1.1	Protocoles de synthèse et choix des organosilanes	116
3.1.1.1	Réactifs utilisés	116

3.1.1.2	Adaptation du protocole de « référence » à la fonctionnalisation par co-condensation	117
3.1.1.3	Protocole de fonctionnalisation issu de la méthode de Gu <i>et al.</i>	118
3.1.2	Caractérisation morphologique des MSNs fonctionnalisées	118
3.1.3	Caractérisation par zétamétrie des propriétés électrocinétiques des MSNs fonctionnalisées	121
3.1.4	Caractérisation de la structure poreuse des MSNs fonctionnalisées	122
3.1.5	Analyse quantitative du taux de fonctionnalisation	124
3.1.5.1	Méthode de détermination du taux de fonctionnalisation par analyse élémentaire	124
3.1.5.2	Méthode de détermination du taux de fonctionnalisation par analyse thermogravimétrique	125
3.1.5.3	Résultats et discussion	127
3.1.6	Caractérisations spectroscopiques des MSNs fonctionnalisées	128
3.1.6.1	Spectroscopie RMN du ^{29}Si à l'état solide	128
3.1.6.2	Spectroscopie FT-IR des MSNs non fonctionnalisées	130
3.1.6.3	Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-NH ₂	131
3.1.6.4	Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-COOH _{rod}	133
3.1.6.5	Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-COOH _{sph}	135
3.1.6.6	Spectroscopie Raman des particules MSNs-SH	136
3.2	Greffage de polymères à la surface externe des MSNs	137
3.2.1	Conditions opératoires	138
3.2.1.1	Réactifs utilisés	138
3.2.1.2	Procédure de greffage des acides carboxyliques à la surface externe des MSNs	139
3.2.1.3	Procédure de greffage des polymères à la surface des MSNs-COOH _{surf}	140
3.2.2	Caractérisation morphologique des MSNs fonctionnalisées	141
3.2.3	Caractérisation par zétamétrie des propriétés électrocinétiques des MSNs greffées	142
3.2.4	Caractérisation de la structure poreuse des MSNs fonctionnalisées	143
3.2.5	Analyse quantitative du taux de greffage	145
3.2.5.1	Méthode de détermination du taux de greffage par analyse élémentaire	145
3.2.5.2	Méthode de détermination du taux de greffage par analyse thermogravimétrique	146
3.2.5.3	Résultats et discussion	148
3.2.6	Caractérisations spectroscopiques des MSNs fonctionnalisées	149

3.2.6.1	Spectroscopies FT-IR et RMN ^{29}Si à l'état solide des particules MSNs-COOH _{surf}	149
3.2.6.2	Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-PEI	151
3.2.6.3	Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-PEG	152
3.2.7	Stabilité des nanoparticules en milieu physiologique	153
3.3	Etude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité des MSNs fonctionnalisées sur des cellules cancéreuses	154
3.3.1	Préparation des échantillons	154
3.3.2	Test de cytotoxicité, coloration au crystal violet et expression des résultats	154
3.3.3	Résultats et discussion	155
3.4	Etude de l'internalisation des MSNs dans des cellules en culture	156
3.4.1	Greffage de rhodamine B silanisée (RBITC-APTES) par co-condensation	156
3.4.1.1	Réactifs utilisés	156
3.4.1.2	Synthèse de RBITC-APTES	156
3.4.1.3	Conditions de greffage de la RBITC-APTES sur les MSNs . . .	157
3.4.1.4	Caractérisations des MSNs fonctionnalisées par la RBITC-APTES	157
3.4.2	Etude <i>in vitro</i> de la cytotoxicité des particules MSNs-Rh	159
3.4.3	Etude de l'internalisation des particules MSNs-Rh par microscopie confocale	159
3.4.3.1	Protocole expérimental et présentation des résultats	160
3.4.3.2	Résultats et discussion	160
3.5	Conclusion	162
4	Encapsulation du cisplatine et comportement en présence de cellules en culture	165
4.1	Détermination spectrophotométrique de la concentration du CDDP en solution aqueuse	165
4.1.1	Dosage spectrophotométrique du CDDP en solution aqueuse	165
4.1.2	Dosage spectrophotométrique de la concentration en CDDP en solution aqueuse par complexation avec l'OPDA	169
4.1.2.1	Protocole expérimental	170
4.1.2.2	Droite d'étalonnage et validation de la méthode	170
4.2	Etude de l'adsorption du CDDP sur les différents types de MSNs	171
4.2.1	Protocole expérimental de la mesure des quantités adsorbées de CDDP par spectrométrie d'absorption UV-visible	171
4.2.2	Protocole expérimental de la mesure des quantités adsorbées de platine par ICP-AES	171
4.2.3	Résultats et discussion	172
4.3	Encapsulation du CDDP dans les MSNs	174
4.3.1	Recherche d'un protocole d'encapsulation par imprégnation	174

TABLE DES MATIÈRES

4.3.2	Détermination des taux encapsulés par ICP-AES	177
4.3.3	Caractérisation des échantillons encapsulés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	178
4.3.4	Caractérisation des échantillons encapsulés par spectroscopie Raman et microscopie électronique en transmission	180
4.4	Comportement des CDDP@X en milieu de culture : test de libération du CDDP	182
4.4.1	Conditions expérimentales	182
4.4.2	Résultats et discussion	183
4.5	Comportement des MSNs@CDDP en présence de cellules en culture	184
4.5.1	Préparation des échantillons	184
4.5.2	Test de cytotoxicité, coloration au crystal violet et expression des résultats	184
4.5.3	Résultats et discussion	185
4.6	Conclusion	187
Conclusion générale		189
Perspectives de ce travail		193
Annexes		195
A	Manométrie d'adsorption/désorption d'azote	195
A.1	Méthode d'analyse expérimentale	196
A.2	Détermination de la surface spécifique, du diamètre des pores et du volume poreux	197
B	Diffraction de rayons X	199
C	Diffusion dynamique de la lumière	201
D	Diffusion électrophorétique de la lumière	203
E	Caractérisations spectroscopiques	204
E.1	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ^{29}Si à l'état solide .	204
E.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	205
F	Caractéristiques des instruments utilisés	207
G	Valorisations des travaux de thèse	207
G.1	Publications	207
G.2	Communications orales	208
G.3	Communications par affiches	208
H	Activités complémentaires	209
H.1	Encadrements scientifiques	209
H.2	Enseignements	209
H.3	Responsabilités administratives	210

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AAS	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
AE	Analyse Élémentaire
APTES	(3-AminoPropyl)TriEthoxy-Silane
ARN	Acide RiboNucléique
ASP	Adsorption sur Solides Poreux
BDDT	Brunauer Deming Deming Teller
BET	Brunauer Emmett Teller
BJH	Barrett Joyner Halenda
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CCC	Concentration Critique de Coagulation
CDDP	<i>Cis-DiammineDichloroPlatine(II)</i>
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives
CEST	CarboxyEthylSilaneTriol
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIRC	Centre International de Recherche contre le Cancer
CMC	Concentration Micellaire Critique
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CNT	NanoTubes de Carbone
CPMAS	<i>Cross-Polarization Magic Angle Spinning</i>
CTAB	Bromure de CétylTriméthylAmmonium
CTACl	Chlorure de CétylTriméthylAmmonium
DDL	Diffusion Dynamique de la Lumière
DMAC	N,N-DiMéthylACétamide (DMAC)
DMF	N,N'-DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DO	Densité Optique
DOX	DOXorubicine
DPBS	<i>Dubecco's Phosphat Bufferd Saline</i>
DPPG	DiPalmitate PhosphatidylGlycérol
DRX	Diffraction des Rayons X
EDC	<i>1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimide hydrochloride</i>
EDS	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
EISA	<i>Evaporation Induced Self-Assembly</i>
EPFL	Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ESI-MS	<i>ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry</i>

F127	PEO ₁₀₆ PPO ₇₀ PEO ₁₀₆
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Spectroscopie I nfra R ouge à T ransformée de F ourier
HF	acide F luor H ydrique
HPMA	N-2- H ydroxy P ropyle M éthacryl A mide
HPLC	C hromatographie en P hase L iquide à H aute P erformance
HSAB	<i>Hard and Soft Acids and Bases</i>
HSM	<i>Hexagonal Mesoporous Silica</i>
IC ₅₀	C oncentration I nhibitrice 50
ICB	Laboratoire I nterdisciplinaire C arnot de B ourgogne
ICMCB	I nstitut de C himie de la M atière C ondensée de B ordeaux
ICMUB	I nstitut de C himie M oléculaire de l' U niversité de B ourgogne
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy</i>
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IHP	<i>Inner Helmholtz Plane</i>
INSERM	I nstitut N ational de la S anté et de la R echerche M édicale
IS2M	I nstitut de S cience des M atériaux de M ulhouse
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LDH	L actate D és H ydrogénase
LTM	Laboratoire des T echnologies de la M icroélectronique
LPT	Laboratoire de T echnologie des P oudres
MaNaPI	M atériaux N anostructurés : P hénomènes à l' I nterface
MAS	<i>Magic Angle Spinning</i>
MCM	<i>Mobil Composition of Matter</i>
MEB	M icroscopie E lectronique à B alayage
MET	M icroscopie E lectronique en T ransmission
MTX	M é T hotre X ate
MMR	<i>MisMatch Repair</i>
MNC	M ilieu N utritif C omplet
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	m éthoxy- P EG P ho S phatidyl E thanolamine
MPTES	(3- M ercapto P ropyl) T ri E thoxy- S ilane
MSNs	<i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>
MSU	<i>Michigan State University</i>
MTS	M atériaux aux T ensioactifs S tructurants
MTT	bromure de 3-(4,5-di M ethyl T hiazol-2-yl)-2,5-diphenyl T etrazolium
NER	<i>Nucleoside Excision Repair</i>
NHS	<i>N-HydroxySuccinimide</i>
OHP	<i>Outer Helmholtz Plane</i>
OMBC3	O rgano M étallique et C atalyse pour une C himie B io- et éco- C ompatible
OMS	O rganisation M ondiale de la S anté
OPDA	<i>OrthoPhénylèneDiAmine</i>
ORL	O to- R hino- L aryngée
P ₀	P ression de vapeur saturante
P123	PEO ₂₀ PPO ₇₀ PEO ₂₀
PAMAM	<i>Poly(AMidoAMine)</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCN	P oint de C harge N ulle
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
PDI	P oly D ispersity I ndex
PEI	P oly E thylène I mine

PEG	Poly E thylène G lycol
PEO	Poly E thylène O xyde
PEI	P oint I so E lectrique
PGA	Poly-L- G lut A mique
P(Glu)	Poly acide G lutamique
PLGA	Poly(A cide L actic- <i>co</i> - G lycolique
PMOS	<i>Periodic Mesoporous Organosilicas</i>
PPO	Poly P ropylène O xyde
PSD	Détecteur S ensible à la P osition
RBTC-APTES	R hodamine B I so T hio C yanate-(3- A mino P ropyl) T ri E thoxy- S ilane
RPMI	<i>Rowell Park Memorial Institute</i>
SAXS	<i>Small Angle X-rays Scattering</i>
SBA	<i>Santa Barbara Amorphous</i>
SPM	Système P hagocytaire M ononucléé
SRE	Système R éticulo- E ndothélial
STEM	<i>Scanning Transmission Electron Microscopy</i>
STEM-HAADF	<i>STEM-High Angle Annular Dark Field</i>
STP	<i>Standard Temperature and Pressure</i>
TEA	T ri E thyl A mine
TESP	anhydride (3- T rim E thoxy S ilyl) P ropylsuccinic
TBOS	T étra B ut O xy S ilane
TEOS	T étra E th O xy S ilane
TLCT	<i>True Liquide-Cystal Templating</i>
USPIO	<i>Ultrasmall SuperParamagnétique Iron Oxide</i>
VIH	V irus de l' I mmunodéficience H umaine
XPS	S pectroscopie de P hotoélectrons X

Introduction

Selon le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC), qui dépend de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de personnes atteintes d'un cancer était égal à 12,6 millions en 2008 et devrait passer à 21,3 millions en 2030. Le nombre de décès suite à cette maladie pourrait donc doubler et s'élever à 13,1 millions à l'horizon 2030 [1, 2].

Une fois le cancer diagnostiqué, les trois thérapies majoritairement utilisées en clinique sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Le traitement des tumeurs par chirurgie demeure la méthode la plus utilisée pour les petits foyers sans métastases mais elle reste perfectible car l'élimination de la totalité des cellules tumorales ainsi que la prévention de leur dissémination sont difficilement contrôlables. Quant à la radiothérapie, elle peut s'avérer très invasive vis-à-vis des cellules saines proches des tissus tumoraux. Lorsque le cancer est à un stade avancé, la chimiothérapie est la méthode de lutte la plus courante associée à la chirurgie mais elle présente des inconvénients majeurs comme des effets secondaires et l'apparition de phénomènes de résistance.

Afin d'augmenter l'efficacité des traitements conventionnels de chimiothérapie anticancéreuse et de réduire leurs effets secondaires, de nombreuses études ont été menées depuis quelques années afin de développer des thérapies ciblées basées sur l'utilisation de nanovecteurs macromoléculaires (liposomes, micelles de copolymères, microémulsions) ou inorganiques (nanotubes, nanoparticules) [3, 4]. Ces stratégies visent à protéger la substance médicamenteuse de son environnement pour qu'elle ne soit pas dégradée trop rapidement ou pour que sa concentration locale ne soit pas trop élevée lors de son administration. Par un ciblage actif ou passif, ces nanovecteurs peuvent s'accumuler au niveau des tissus tumoraux et ainsi délivrer l'agent anticancéreux avec une plus grande efficacité dans les cellules tumorales [5]. Parmi ces nanovecteurs, le Caelyx[®], à base de liposomes pegylés, est déjà utilisé chez des patients atteints de cancer du sein, de l'ovaire ou encore chez des patients atteints d'un sarcome de Kaposi à un stade avancé d'infection par le VIH [3, 6]. D'autres formulations liposomales sont également utilisées en clinique comme l'Ambisome[®], l'Abraxane[®] ou le DaunoXome[®] [3].

Le cisplatine ou cis-diamminedichloroplatine(II) est l'un des agents anticancéreux les plus efficaces et les plus utilisés en clinique pour traiter les cancers de l'ovaire, du testicule, de

l'œsophage ou encore du col de l'utérus [7]. Cependant, son utilisation présente deux limites. D'une part, ce composé n'est pas spécifique, c'est-à-dire qu'il ne fait la différence entre une cellule saine et une cellule cancéreuse. Ce phénomène est à l'origine de nombreux effets secondaires qui sont associés à des toxicités hématologiques, rénales et neurologiques. D'autre part, les cellules cancéreuses développent des phénomènes de résistance qui limitent l'efficacité de ce composé. Dans le cadre du développement de thérapies ciblées, une formulation liposomale à base de cisplatine, appelée LipoplatinTM, fait actuellement l'objet d'un essai clinique randomisé de phase III chez des patients atteints de cancer du poumon [8, 9]. Une formulation polymérique appelée ProLindacTM véhiculant un des dérivés du platine, l'oxaliplatine, est aussi à l'étude dans plus de huit centres européens pour le traitement de cancers de l'ovaire résistants [8, 10]. Bien que ces systèmes organiques soient à un stade de développement avancé, ils souffrent d'une faible stabilité chimique et d'un faible taux d'encapsulation, ce qui limite considérablement leurs voies d'administration, leur durée de conservation et leur efficacité [11]. Par conséquent, de plus en plus d'études portent sur l'utilisation de nanovecteurs inorganiques notamment à base de silice.

Parmi ces systèmes de vectorisation, les Nanoparticules Mésoporeuses de Silice (MSNs, acronyme anglais pour *Mesoporous Silica Nanoparticles*) pourraient constituer une solution prometteuse [12]. En effet, la taille des nanoparticules peut être contrôlée pour qu'elles s'accumulent préférentiellement dans la zone tumorale (taille optimale comprise entre 60 et 150 nm). Ces nanoparticules possèdent aussi des propriétés structurales et texturales uniques parfaitement adaptées à la vectorisation médicamenteuse, telles qu'une structure poreuse organisée, une surface spécifique élevée ($> 700 \text{ m}^2/\text{g}$), un volume poreux important ($> 1 \text{ cm}^3/\text{g}$) ainsi qu'une taille de pore modulable (de 2 à 10 nm) [13, 14]. De plus, les MSNs comportent des groupements hydroxyles de surface qui peuvent être modifiés par des groupements fonctionnels et/ou par des polymères. Ces modifications peuvent permettre (i) de moduler les interactions matrice/molécule anticancéreuse afin d'optimiser le taux d'encapsulation du médicament et de contrôler la cinétique de libération de cette molécule [15], (ii) d'éviter l'agglomération et la sédimentation des nanoparticules en conditions physiologiques [16]. Par un choix judicieux de leurs propriétés physico-chimiques, les MSNs semblent donc adaptées à la vectorisation d'anticancéreux peu solubles dans l'eau comme le cisplatine [17, 18].

L'équipe MaNaPI (Matériaux Nanostructurés : Phénomènes à l'Interface) du laboratoire ICB (Interdisciplinaire Carnot de Bourgogne) est reconnue depuis plus de 20 ans pour ses compétences dans le domaine de l'élaboration de poudres nanométriques ou de massifs nanostructurés. Elle développe aussi une nouvelle thématique innovante intitulée « nanomatériaux appliqués au domaine de la santé ». C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse qui porte sur le **développement d'un nouveau nanovecteur inorganique à base de silice pour contrôler la libération de cisplatine**. Elle a été réalisée en collaboration avec l'équipe ASP (Adsorption sur Solides Poreux) du laboratoire ICB, mais également avec une équipe INSERM

(Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) de Dijon, reconnue pour ses travaux portant sur l'étude des mécanismes de résistance acquise aux dérivés du platine [19, 20].

Le principal objectif de cette thèse a été de synthétiser des nanoparticules mésoporeuses de silice qui ressemblent à celle décrite dans la Figure 1. Elles doivent impérativement répondre aux critères suivants : une taille contrôlée entre 60 nm et 150 nm, un volume poreux élevé, une chimie de surface adaptable pour encapsuler une quantité d'agent anticancéreux la plus grande possible, une stabilité colloïdale et structurale des nanomatériaux à long terme. Nous avons également étudié les conditions de fonctionnalisation des nanoparticules pour que le cisplatine soit libéré par la matrice poreuse de façon prolongée. Finalement, nous avons considéré le problème de l'internalisation des nanoparticules dans des cellules cancéreuses pour s'assurer que le nanovecteur amène de façon efficace la substance médicamenteuse.

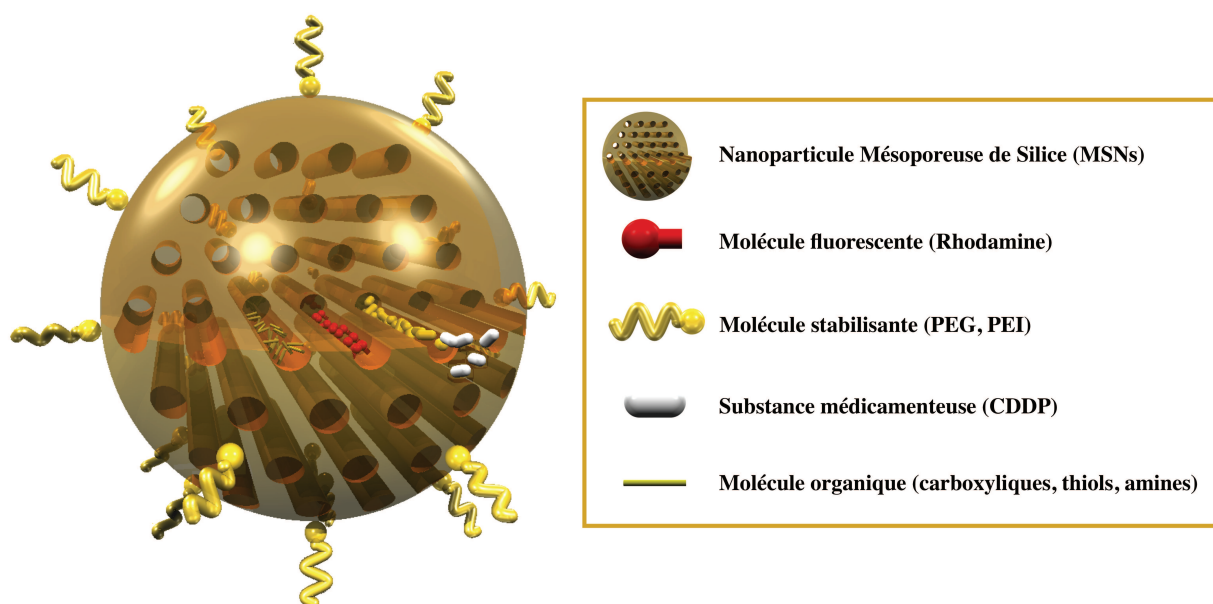


FIGURE 1 : *Représentation d'un vecteur à base de silice stabilisé par des polymères, couplé à une molécule fluorescente, fonctionnalisé par des molécules organiques et « encapsulé » en anticancéreux.*

Pour répondre à ces objectifs, le manuscrit est organisé en quatre chapitres.

Le chapitre 1 présente une étude bibliographique sur les Matériaux aux Tensioactifs Structurants (MTS), ainsi que sur les différentes voies de synthèse des MSNs et les principales stratégies de fonctionnalisation de ces nanomatériaux. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à un état de l'art sur les nano-objets développés pour vectoriser le cisplatine.

Le chapitre 2 est consacré à **la maîtrise de la synthèse des nanoparticules mésoporeuses de silice** par hydrolyse et condensation du TétrahydroxySilane (TEOS) en milieu basique et en présence d'une solution diluée de Bromure de CétyleTriméthylAmmonium (CTAB). L'influence de plusieurs paramètres de synthèse tels que le pH, la vitesse d'agitation, la

température et le mode d'extraction du CTAB sur les propriétés morphologiques, structurales et texturales des matériaux obtenus a pu être évaluée. La stabilité structurale et colloïdale des MSNs a également été étudiée en fonction des conditions de synthèse et de conservation. L'étude de la cytotoxicité *in vitro* des nanoparticules poreuses est présentée et corrélée au protocole d'extraction du tensioactif.

Le chapitre 3 aborde **la fonctionnalisation** des nanoparticules. Le greffage de divers groupements organiques de type organosilane (APTES, TESP, MPTES, CEST) et de polymères neutres ou ionisés (PEG, PEI) est décrit. L'innocuité de ces particules modifiées est vérifiée *in vitro*. De plus, une étude sur l'internalisation des MSNs fonctionnalisées par une molécule fluorescente (Rhodamine) dans des cellules cancéreuses est présentée.

Le chapitre 4 concerne **l'encapsulation** du cisplatine dans les différentes nanoparticules fonctionnalisées. Deux méthodes ont été envisagées, à savoir l'adsorption et l'imprégnation par voie liquide. Les capacités d'encapsulation et les cinétiques de libération du cisplatine ont été évaluées en fonction des groupements organiques et des polymères greffés. Après optimisation des conditions d'encapsulation, l'effet cytotoxique des différentes formulations est étudié *in vitro* et corrélé aux cinétiques de libération du cisplatine.

Une conclusion générale et des perspectives à ces travaux de thèse clôturent ce manuscrit.

Chapitre 1

Contexte de l'étude

L'objectif de ce premier chapitre est de présenter les notions de base nécessaires à la compréhension du travail exposé dans ce manuscrit. Après une première partie portant sur les principes régissant l'élaboration des Matériaux aux Tensioactifs Structurants (MTS), les différentes voies de synthèse des Nanoparticules Mésoporeuses de Silice (MSNs) sont présentées. Afin de contrôler l'affinité chimique entre les nanoparticules et la substance médicamenteuse ou de stabiliser les nanovecteurs en conditions physiologiques, la chimie de surface de ces derniers doit être modulée. Ainsi, les principales méthodes de modification de surface des matériaux mésoporeux siliciques sont décrites dans une troisième partie dans le but d'établir la méthode la plus adaptée à la fonctionnalisation des MSNs. Enfin, la dernière partie présente un état de l'art sur les nano-objets développés pour vectoriser le cisplatine.

1.1 Les matériaux aux tensioactifs structurants

1.1.1 Les matériaux mésoporeux siliciques

D'après la classification faite par l'IUPAC¹, les solides poreux sont classés en fonction de leur taille de pores en trois catégories principales [21], comme le montre la Figure 1.1. Les matériaux microporeux tels que les zéolithes sont des structures inorganiques ayant cristallisé généralement autour de molécules chargées (agents structurants), plus ou moins volumineuses, comme par exemple des ammoniums quaternaires ou des ions minéraux [22]. Après retrait par calcination ou lavage de ces molécules structurantes, le matériau inorganique obtenu peut comporter plusieurs types de pores parfaitement définis. De tels matériaux, souvent aussi appelés tamis moléculaires, sont principalement utilisés comme catalyseurs, adsorbants ou échangeurs d'ions car ils permettent un tri stérique entre les molécules et/ou induisent une conformation de produit plutôt qu'une autre par effet de confinement [23, 24]. La taille des cages poreuses des zéolithes, généralement inférieure à 1,5 nm [25], limite l'application de ces systèmes poreux à de petites molécules.

1. International Union of Pure and Applied Chemistry.

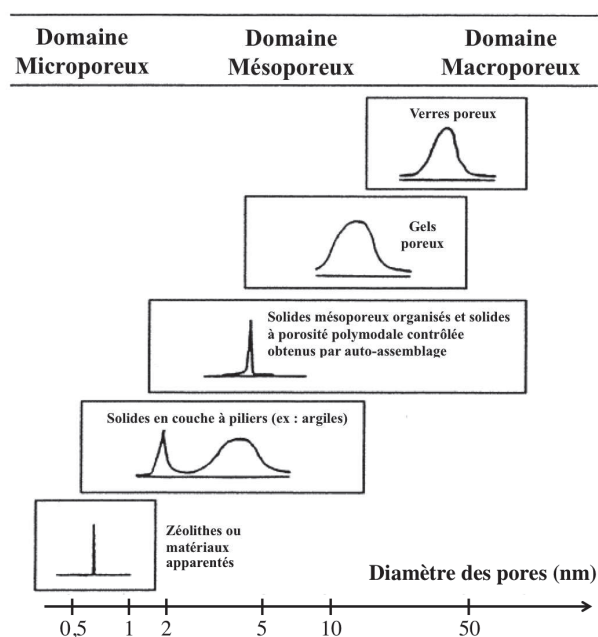


FIGURE 1.1 : Représentation schématique de la classification IUPAC¹ des solides poreux en fonction du diamètre des pores. D'après [22].

Au-delà d'une taille de pores supérieure à 50 nm, les matériaux correspondants (verres, gels) sont appelés macroporeux. Ils sont également utilisés en tant qu'adsorbants ou catalyseurs mais leur utilisation est limitée à cause de leur faible surface spécifique et de leur distribution en taille de pore très large [26, 27]. Afin d'obtenir des tailles de pores plus importantes que celles des zéolithes, une alternative a été mise au point il y a maintenant une vingtaine d'années par une équipe de la Mobil Oil Corporation. En introduisant dans un milieu de synthèse de précurseur de zéolithes, des agents tensioactifs de type ammonium quaternaire formant des agrégats supramoléculaires en solution, ces chercheurs ont obtenu un matériau organisé dont les empreintes possèdent une taille supérieure à celle trouvée habituellement pour les zéolithes (qui ne dépasse généralement pas 1,5 nm). Ces matériaux ont été synthétisés pour la première fois en 1971 par le même groupe pétrolier Mobil mais à cause d'une description limitée de la synthèse et des caractéristiques du matériau obtenu, la découverte est restée inexploitée [28]. Ce n'est qu'en 1992 que ces matériaux ont été clairement identifiés [29]. Contrairement aux zéolithes, les parois des structures inorganiques poreuses obtenues après élimination de l'agent structurant ne sont pas cristallisées mais amorphes.

Dès lors, une nouvelle famille de silicates et aluminosilicates appelée M41S et dont le nom générique est « Matériaux aux Tensioactifs Structurants » est apparue. Ces matériaux regroupent les phases MCM-41² de structure hexagonale ($P6mm$), MCM-48 de structure cubique ($Ia\bar{3}d$) et MCM-50 ($P2$) de structure lamellaire [30–32]. Quelques années plus tard, une nouvelle voie de synthèse menant à des matériaux mésoporeux organisés appelée SBA³ est réalisée à partir de tensioactifs anioniques et cationiques [33]. Ces synthèses mènent à la formation de matériaux de type SBA-1, SBA-2 et SBA-3 [34, 35]. En 1995, la première synthèse de matériaux mésoporeux

2. MCM : Mobil Composition of Matter.

3. SBA : Santa Barbara Amorphous.

nommés HMS⁴ obtenus à partir de tensioactifs neutres de type amine primaire est reportée par Tanev *et al.* [36]. Ces matériaux sont caractérisés par une porosité désordonnée et tortueuse dite vermiculaire, des murs épais (2-3 nm) et par la présence d'une mésoporosité texturale importante. Par la suite, Bagshaw *et al.* ont présenté une deuxième famille de matériaux appelée MSU⁵ synthétisée à partir de copolymères neutres de type oxydes polyéthoxylés [37]. A partir de copolymères séquencés amphiphiles, Zhao *et al.* ont synthétisé d'autres types de matériaux de la famille SBA [38, 39]. Plus récemment, d'autres matériaux mésoporeux sont apparus comme les structures de type CMI [40], FDU [41, 42], TUD [43]...

1.1.2 Comportement des tensioactifs en solution

Un tensioactif (TA) est une molécule amphiphile qui possède une partie peu polaire de caractère hydrophobe et une partie polaire à caractère hydrophile, reliées entre elles par une liaison covalente (Figure 1.2). C'est l'existence de cette différence d'affinité au sein d'une même molécule qui est à l'origine de leurs propriétés d'auto-organisation dans un solvant où seulement un des domaines y possède une grande polarité. Ces molécules ont la capacité de s'adsorber aux interfaces et induisent une diminution de la tension de surface du solvant, ce qui leur a valu le nom de « tensioactifs ».

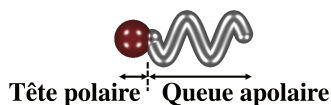


FIGURE 1.2 : Représentation schématique d'une molécule tensioactive.

Les tensioactifs se différencient par la nature de leur tête polaire : ionique (sulfate, sulphonate, phosphate, ammonium quaternaire...), zwitterionique (la tête comporte deux charges égales et opposées), neutre (amine...) ou non-ionique (chaîne oligomérique de polyoxyéthylène PEO...), et par la nature et la structure de la partie hydrophobe : monocaténaire, bicaténaire, hydrocarbonée, perfluorée... D'un point de vue thermodynamique, la molécule de tensioactif cherche en permanence à minimiser son énergie libre. En solution aqueuse, les interactions entre les têtes polaires et le solvant induisent des diminutions d'énergie tandis que les interactions entre les parties hydrophobes et l'eau induisent une augmentation d'énergie. Les parties hydrophobes des tensioactifs vont avoir tendance à s'associer, formant une pseudo-phase organique, réduisant les interactions entre l'eau et la partie hydrophobe et favorisant la solvation des têtes polaires. L'agrégation et la morphologie des objets obtenus est le résultat de l'équilibre entre les interactions attractives des parties hydrophobes et les interactions répulsives des têtes polaires.

Basé sur des considérations géométriques, un modèle simple a été proposé par Israelachvili *et al.* [44] et permet de prédire la forme des structures résultant de l'auto-assemblage des

4. HSM : Hexagonal Mesoporous Silica.

5. MSU : Michigan State University.

1.1. Les matériaux aux tensioactifs structurants

tensioactifs. Pour cela, les auteurs ont défini un paramètre d'empilement ou facteur de forme g défini par l'équation suivante :

$$g = \frac{V}{a_0 l_c} \quad (1.1)$$

où V est le volume occupé par la chaîne hydrophobe du tensioactif, a_0 l'aire de la tête polaire et l_c la longueur critique de la chaîne hydrophobe, comme définis sur la Figure 1.3.

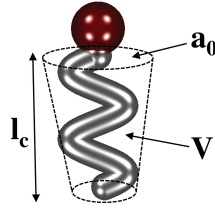


FIGURE 1.3 : Représentation schématique d'un tensioactif sous forme d'un cône [22].

Grâce à ce paramètre d'empilement g , la structure des agrégats peut être déduite de la structure géométrique des tensioactifs (Tableau 1.1) [44, 45]. Le paramètre g dépend des composantes du milieu telles que la force ionique et la nature des sels en présence.

TABLEAU 1.1 : Morphologie des agrégats en fonction de la valeur du paramètre d'empilement g du tensioactif.

Amphiphile	Paramètre g	Forme géométrique	Géométrie des micelles	Mésophase
TA monocaténaire à large tête polaire	$< \frac{1}{3}$		Sphérique	Cubique ($Pm\bar{3}n$)
TA monocaténaire type non ionique	$\frac{1}{3} < \frac{1}{2}$		Cylindrique	Hexagonale ($P6mm$)
TA bolaforme ou bicaténaire à large tête polaire	$\frac{1}{2} < 1$		Vésicules ou bicouches	Cubique ($Ia\bar{3}d$)
TA bicaténaire	~ 1		Bicouches planes	Cubique ($Ia\bar{3}d$) ou Lamellaire
TA bicaténaire à tête polaire petite	> 1		Micelles inverses	Lamellaire

Le paramètre g , qui détermine la morphologie des agrégats formés, dépend de la température et de la concentration en tensioactif. Le diagramme de phase du $C_{16}TAB$ ⁶ dans l'eau, représenté sur la Figure 1.4, permet de prévoir le type d'arrangement adopté en fonction de ces deux paramètres [46]. A une température donnée et lorsque la concentration est faible, le tensioactif est

6. Bromure de cetyltriméthyl-ammonium : $(CH_3)(CH_2)_{15}N(CH_3)_3^+Br^-$

présent sous forme libre en solution et adsorbé aux interfaces. Pour une concentration légèrement plus élevée, appelée concentration micellaire critique (CMC1), les molécules de tensioactifs s'auto-organisent et forment des micelles sphériques. Cette transformation est expliquée par le fait que lorsque la concentration augmente, la distance entre les molécules diminue, ce qui implique que les forces de répulsion qui s'exercent entre elles augmentent, favorisant ainsi la formation d'agrégats les plus petits possibles (les micelles s'auto-organisent). Lorsque la concentration en tensioactif augmente encore, la quantité de solvant entre les micelles diminue (CMC2). A cette concentration, la limite de stabilité des micelles sphériques est atteinte et des micelles cylindriques sont formées. A mesure que la concentration augmente, le tensioactif s'arrange de manière à obtenir une mésophase hexagonale, cubique puis lamellaire (Figure 1.4).

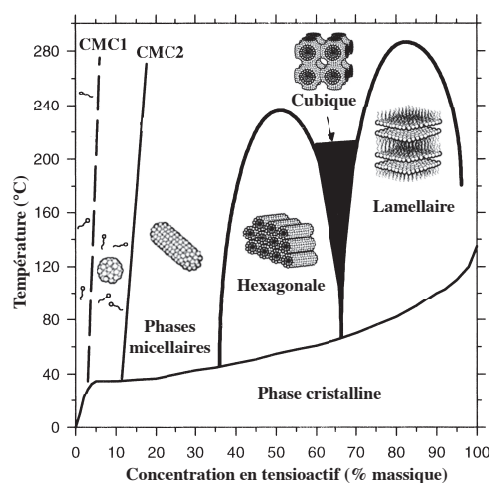


FIGURE 1.4 : Diagramme de phase du bromure de cetyltriméthyl ammonium, $(CH_3)(CH_2)_{15}N(CH_3)_3^+ Br^-$ ou $C_{16}TAB$ dans l'eau. D'après [46, 47].

1.1.3 Elaboration de matériaux siliciques par voie sol-gel

La chimie des molécules amphiphiles est extrêmement riche et de nombreuses morphologies différentes sont possibles. Cependant, ces structures auto-organisées sont dynamiques et donc réversibles par dilution ou par modification des paramètres du milieu tels que la force ionique ou la température. Le fait qu'elles n'aient pas de propriétés mécaniques robustes constitue un frein à de nombreuses applications. Par conséquent, la combinaison de la physico-chimie d'assemblage de la matière molle avec le procédé sol-gel [48] permet de mettre en forme divers types de solides en prenant l'empreinte des mésophases organiques pour former des matériaux possédant de bonnes propriétés mécaniques.

Depuis la découverte par la Mobil Oil Corporation des matériaux mésoporeux, cette méthode s'est imposée comme l'une des plus importantes et prometteuses voies de fabrication de nouveaux matériaux organisés. Cette méthode est particulièrement intéressante puisqu'elle permet de se placer dans des conditions de synthèse adaptées à la nature des interactions entre la phase organique et inorganique. De plus, la voie sol-gel offre la possibilité de contrôler les vitesses d'hydrolyse et de condensation des précurseurs organométalliques du système réactionnel en

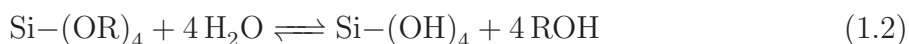
jouant sur les paramètres expérimentaux tels que le pH, les concentrations en réactif, la température et la nature du solvant, ce qui permet l'obtention des mésophases organisées organiques/inorganiques.

La première polymérisation « sol-gel » a été réalisée par Ebelmen, qui décrit dès 1844 « la conversion en verre solide de l'acide silicique exposé à l'air humide ». Cette découverte n'est reprise qu'un siècle plus tard par la firme allemande *Schott Glaswerke* pour la production de récipients en verre [49]. Ce procédé est actuellement utilisé dans de nombreux domaines notamment pour l'élaboration de particules sphériques d'oxydes, de nitrures ou de carbures [50–57].

La méthode « sol-gel » a pour principe la gélification d'un **sol** qui est une suspension colloïdale d'oligomères dont le diamètre est de quelques nanomètres seulement. Le **gel** qui en résulte, est un état intermédiaire de la matière situé entre l'état solide et l'état liquide. Un gel peut être vu comme un réseau tridimensionnel solide à viscosité infinie qui s'est étendu au travers d'un liquide. La synthèse de réseaux d'oxydes par voie « sol-gel » se déroule *via* des réactions de polymérisations inorganiques à partir de précurseurs moléculaires généralement de type alkoxydes métalliques de formule brute $M(OR)_m$ où M représente le centre métallique (Si, Ti, Zr, Al, Sn...), m son état d'oxydation et R un groupement alkyl C_nH_{2n+1} . Nous nous limiterons ici au cas du silicium ($M = Si$).

La polymérisation inorganique des précurseurs a lieu en deux étapes : l'**hydrolyse**, qui correspond à la réaction d'activation, et la **condensation - polymérisation**, qui est l'étape de croissance des chaînes :

- l'**hydrolyse** est une réaction de substitution nucléophile qui peut se répéter sur tous les groupements $-OR$ de l'alcoolate [58]. Elle conduit à la formation de l'acide silicique $Si(OH)_4$ et libère des molécules d'alcool (équ. 1.2). Ces acides monosiliciques peuvent se condenser et former des acides disiliciques, oligosiliciques et polysiliciques amenant à des particules primaires de silice. La réaction d'hydrolyse, qui présente une vitesse minimale à pH 7 et maximale à des pH extrêmes (Figure 1.5) [48], est catalysée en milieu acide ;



- la **condensation** est également une réaction de substitution nucléophile. Elle se traduit soit par une expulsion d'eau par réaction entre deux groupements silanols, soit par le départ de molécules d'alcool (ROH) par réaction entre un groupement silanol et un groupement alkoxy (équ. 1.3). Cette étape de condensation conduit à la formation de ponts siloxanes ($-Si-O-Si-$) qui constituent l'unité de base du polymère inorganique. Au point isoélectrique de la silice (pH ~ 2) [59, 60], la vitesse de condensation est minimale (Figure 1.5) car les silicates déprotonés sont très peu réactifs. Cette réaction peut être catalysée par l'ajout d'anions fluorure F^- [61]. Lorsque le pH augmente, les anions silicates se forment et se comportent comme des agents nucléophiles forts qui attaquent les sites électronégatifs portant des alkoxy-silanes déprotonés, favorisant ainsi la ramification des structures siliciques (Figure 1.5).



où $\text{X} = \text{H}$ ou R .

Finalement, l'équation globale de la réaction s'écrit :



Le résultat des réactions d'hydrolyse et de condensation dépend de nombreux facteurs expérimentaux tels que la température, la force ionique ou le pH. Par exemple, la chimie des alcoolates du silicium conduit à des gels polymériques (polymères linéaires) ou colloïdaux (réseau tridimensionnel de particules enchevêtrées) selon que les conditions de pH soient en-dessous ou au-dessus du point isoélectrique de la silice ($\text{pH} \sim 2$) et/ou la proportion d'eau utilisée pendant la réaction [62].

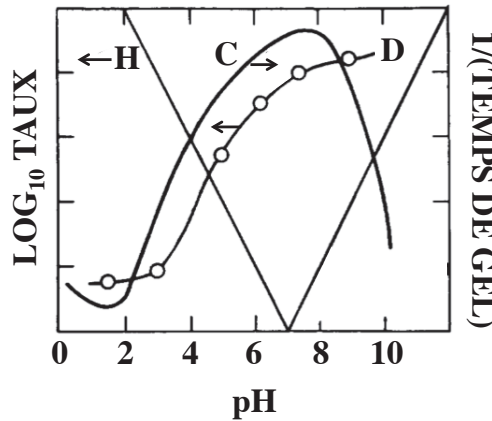


FIGURE 1.5 : Effet du pH sur les vitesses des réactions d'hydrolyse (*H*) et de dépolymérisation (*D*) ainsi que sur l'inverse du temps de gel (condensation, *C*). D'après la référence [63].

La vitesse de condensation est également influencée par la solubilité de la silice qui dépend fortement du pH, comme le montre la Figure 1.5. A partir d'un pH égal à 7, la dissolution de la silice est importante et participe à l'apport de monomères générant de grosses particules stabilisées par des répulsions électrostatiques. Ainsi, les vitesses des réactions d'hydrolyse et de condensation dépendant fortement du pH, la morphologie et la structure des matériaux siliciques vont donc fortement en dépendre [48, 51, 64–67].

1.1.4 Elaboration des matériaux mésoporeux de la famille M41S

La mise en contact de précurseurs minéraux polycondensables en présence d'agents tensioactifs provoque dans certaines conditions de température et de pH, la précipitation d'une phase solide inorganique organisée autour des micelles de tensioactifs. En fonction des conditions de synthèse et de l'agent structurant, les interactions entre la phase inorganique (I) et organique (S), conditions *sine qua non* à l'obtention des matériaux mésoporeux, vont être différentes. Ces interactions peuvent être classées en trois groupes selon leur nature (Figure 1.6) :

Electrostatique :

- le tensioactif S et la phase inorganique I sont sous forme ionique et de charges opposées S^+I^- ou S^-I^+ . Exemples : MCM-41, MCM-48, MCM-50 [30–32] ;
- le tensioactif S et la phase inorganique I sont sous forme ionique et de même charge. L'interaction se fait par intercalation d'un contre-ion (M^+ ou X^-) : $S^+X^-I^+$ ou $S^-M^+I^-$. Exemples : SBA-1, SBA-3, oxydes métalliques (Pb, Fe, Mn, Mg, Co, Ni, Zn, Al, Sb, Ga) [34] ;
- la phase inorganique I est chargée positivement, et le tensioactif S se charge positivement par association avec des protons. L'interaction se fait également par intercalation d'un contre-ion : $S^0(IX)^0$. Exemples : SBA-15, SBA-16 [38, 39].

Liaisons hydrogène :

- le tensioactif non ionique S et le précurseur inorganique I, qui se présente sous la forme d'un hydroxyde très faiblement chargé, interagissent grâce à une liaison hydrogène : S^0I^0 . Exemples : HMS [36] ;
- le tensioactif N est neutre (amine à longue chaîne) et le précurseur inorganique I est sous forme hydroxyde : N^0I^0 . La notation utilisée est différente du cas précédent, les amines pouvant être partiellement protonées selon les conditions de synthèse. Exemples : MSU [37].

Liaisons covalentes :

- une partie du précurseur inorganique I contient une chaîne alkyle hydrophobe S qui joue le rôle de tensioactif et s'organise en micelles lors de la condensation du réseau inorganique (S-I). Exemples : TMS-1 [68].

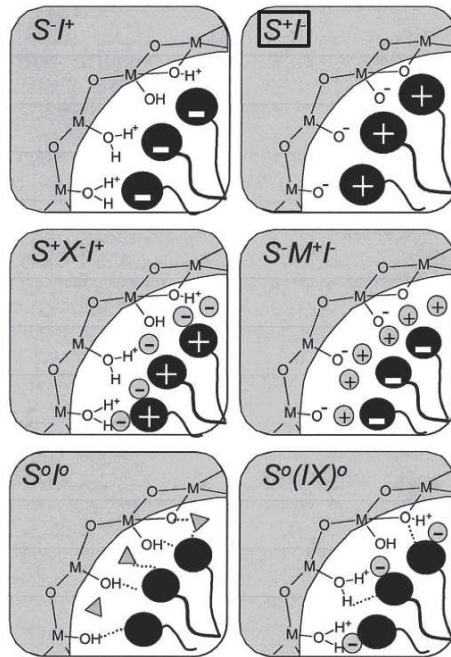


FIGURE 1.6 : Représentation schématique des différentes interactions entre l'agent structurant et la phase inorganique. S représente l'agent structurant et I, la phase inorganique. M^+ et X^- correspondent aux contre-ions. Le solvant n'est pas indiqué à l'exception du cas S^0I^0 où il est représenté par des triangles. Les lignes en pointillés correspondent aux liaisons hydrogènes. D'après la référence [22].

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser exclusivement aux matériaux appartenant à la famille d'aluminosilicates mésoporeux M41S, dont les interactions sont de type électrostatique S^+I^- . Les représentants les plus connus de cette famille sont les solides siliciques MCM-41, dont l'arrangement des canaux est hexagonal 2D ($P6mm$), MCM-48, d'arrangement 3D cubique ($Ia\bar{3}d$) et MCM-50, de structure lamellaire ($P2$). La Figure 1.7 présente ces trois structures.

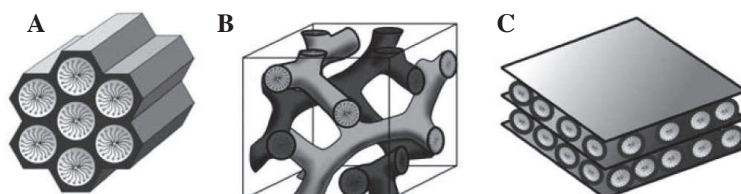


FIGURE 1.7 : Structure des matériaux de la famille M41S. (A) MCM-41, (B) MCM-48 et (C) MCM-50. D'après la référence [69].

Ces matériaux sont obtenus par assemblage de précurseurs de silice par condensation en milieu basique et en présence de tensioactifs, des halogénures d'alkyltriméthylammonium à longue chaîne (agents structurants). Les matériaux mésoporeux sont obtenus après élimination de l'agent structurant par calcination ou extraction par voie chimique.

L'étude du mécanisme soutenant la synthèse de ces matériaux a suscité de nombreux travaux. Initialement, deux voies ont été proposées par la Mobil Oil Corporation (Figure 1.8) [30, 31].

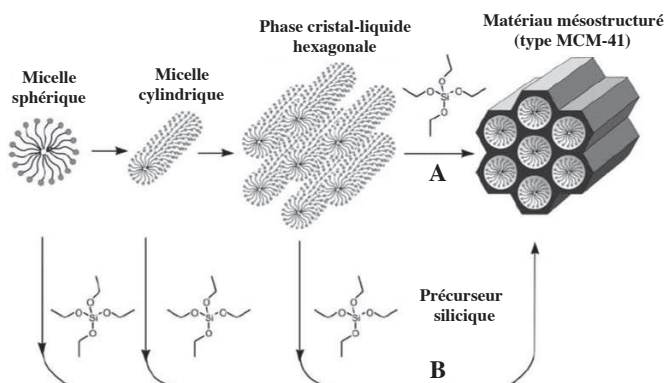


FIGURE 1.8 : Représentation schématique des deux mécanismes de formation des MCM-41 proposés par Beck et al. [30]. (A) Voie « True Liquide-Crystal Templating » (TLCT), (B) Voie auto-assemblage. D'après la référence [69].

Le premier mécanisme (voie A, Figure 1.8) repose sur l'agrégation des micelles cylindriques de tensioactifs en réseau hexagonal sans que le précurseur silicique ne prenne part à la formation de la mésophase. Ce mécanisme implique de se placer à des hautes concentrations en tensioactif et porte le nom de TLCT pour *True Liquid-Crystal Templating*. Cependant, ce mécanisme n'est pas envisageable au regard de la concentration en tensioactif utilisée, qui est bien trop inférieure à celle requise pour la formation d'une phase cristal-liquide [70]. De plus, Chen *et al.* ont mis en

évidence par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ^{14}N que la phase cristal-liquide n'était pas formée durant la synthèse [71]. Le deuxième mécanisme (voie **B**, Figure 1.8) proposé par la Mobil Oil Corporation implique une auto-association des molécules de tensioactif et des précurseurs siliciques menant à la formation des phases hexagonales, cubiques ou lamellaires [33, 35, 72].

Un troisième mécanisme, appelé *charge density matching*, a aussi été proposé par Monnier *et al.* [72] et Stucky *et al.* [73]. Ces auteurs ont observé par Diffraction des Rayons X (DRX) que la phase initiale dans le milieu réactionnel était lamellaire et devait être formée à cause des interactions électrostatiques fortes entre les silicates et la tête polaire du tensioactif cationique. A ce stade de la synthèse, la densité de charge des oligomères de silice est suffisante pour permettre une configuration lamellaire du tensioactif. Lorsque la polymérisation progresse, la densité de charge des polysilicates diminue, ce qui augmente l'aire moyenne des groupes de tête de l'assemblée du tensioactif. L'électroneutralité devant être conservée, le rapport silice/tensioactif augmente, ce qui conduit à la mésophase hexagonale.

Dans des conditions expérimentales où la condensation des espèces silicatées n'est pas favorisée (température basse et $\text{pH} \sim 14$), Firouzi *et al.* démontrent par spectroscopie RMN ^2H et ^{29}Si ainsi que par diffusion des rayons X aux petites angles (SAXS) que la formation de ces matériaux mésoporeux implique un mécanisme d'auto-association coopératif des silicates et des molécules de tensioactifs (Figure 1.9) [74].

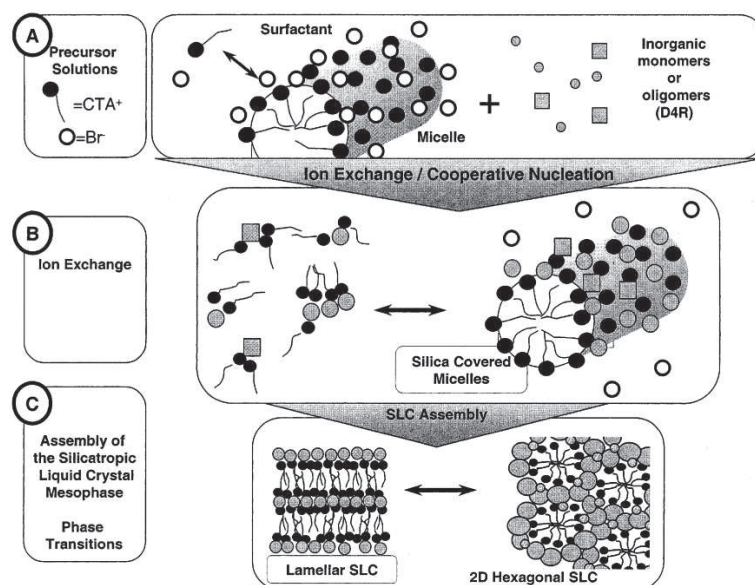


FIGURE 1.9 : Représentation schématique du mécanisme de formation impliquant une organisation coopérative proposée par Firouzi *et al.*. D'après la référence [22].

La Figure 1.9 résume le mécanisme : lors de l'addition d'une solution très alcaline d'espèces silicates à une solution aqueuse de tensioactifs cationiques $\text{C}_{16}\text{TA}^+\text{Br}^-$ (**A**), les contre-ions halogénures présents à la surface des micelles s'échangent avec les ions silicates (**B**), ce qui mène à la formation d'une phase composée d'agrégats micellaires hydrides tensioactifs-silicates après initiation de la polymérisation par abaissement du pH du milieu réactionnel. L'obtention de la silice mésostructurée organisée se fait ensuite par une transition de phase (**C**) qui a lieu pendant

les étapes de précipitation-vieillissement du milieu réactionnel par un traitement hydrothermal.

Du fait de leurs propriétés structurales et texturales très intéressantes, les **matériaux mésoporeux siliciques** ont reçu une très grande attention ces vingt dernières années tant au niveau de leur synthèse que de leur application. Ces matériaux possèdent une distribution en taille de pore étroite et ajustable (2 à 30 nm), une surface spécifique élevée ($> 1000 \text{ m}^2/\text{g}$) et une structure poreuse périodique. De plus, ces matériaux offrent la possibilité d'être modifiables par divers groupements fonctionnels. Ces propriétés désignent ces matériaux comme supports pour la catalyse [27, 75], l'adsorption [76, 77], la séparation [78], la chromatographie [79] ou encore pour la libération de molécules anticancéreuses [14, 80].

En effet, la structure poreuse périodique des matériaux mésoporeux permettrait de contrôler la libération de l'anticancéreux, leur volume poreux élevé maximiserait les quantités de principe actif, leur surface spécifique élevée ouvrirait la voie à l'adsorption et la présence des groupements silanols de surface autoriserait la fonctionnalisation par des groupements fonctionnels spécifiques afin de contrôler les cinétiques de libération ainsi que les taux d'encapsulation [14]. Dans le but de réaliser un ciblage des tissus tumoraux par voie passive ou active, il convient de disposer d'objets submicroniques dont la taille est parfaitement contrôlée (voir paragraphe 1.5.1.3). Dernièrement, des études ont été menées dans ce sens. Dans la partie suivante, nous présenterons les différentes stratégies de synthèse conduisant à la synthèse de Nanoparticules Mésoporeuses de Silice (MSNs).

1.2 Etat de l'art sur les différentes voies de synthèse des MSNs

Après la découverte des matériaux mésoporeux par la Mobil Corporation [30, 31], des efforts considérables ont été consentis afin de synthétiser des objets submicroniques présentant des propriétés physico-chimiques parfaitement contrôlées. En effet, la maîtrise simultanée de la texture, de la taille, de la morphologie et de la dispersion des particules en dessous du micromètre constitue un défi et un pré-requis pour utiliser ces matériaux dans des domaines tels que la séparation (chromatographie) ou la médecine [81–83]. De manière générale, la stratégie développée consiste à **limiter** les réactions d'hydrolyse et de condensation du précurseur silicique afin de contrôler la morphologie des particules.

La plupart des méthodes développées pour synthétiser des sphères de silice mésoporeuse submicroniques sont basées sur la méthode de Stöber [57]. Proposée dans les années 1960, elle permet l'obtention de sphères de silice colloïdale monodisperses dont les tailles sont situées entre 0,05 et 2 μm , en fonction des conditions opératoires de synthèse. Elle consiste en l'hydrolyse catalysée en milieu ammoniacal et alcoolique du tétraéthoxysilane (TEOS) suivie de la condensation des espèces en solution. Généralement, l'(es) alcool(s) et la(es) solution(s) d'ammoniaque sont mélangés avant d'ajouter le(s) tétraalcoxyde(s) de silicium. La taille des particules s'est

1.2. Etat de l'art sur les différentes voies de synthèse des MSNs

avérée être dépendante du type de silane, du mode d'ajout du TEOS, de la concentration en ammoniacque ainsi que de l'alcool utilisé, comme illustré sur la Figure 1.10 [56–58, 84, 85].

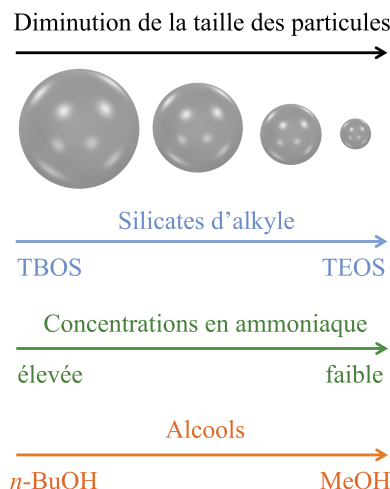


FIGURE 1.10 : Représentation schématique de l'influence des paramètres de réaction sur la taille de sphères de silice préparées avec la méthode de Stöber. Inspirée de [83].

Basée sur une modification du procédé de Stöber, Büchel *et al.* ont proposé pour la première une méthode permettant la synthèse de billes de silice poreuse d'un diamètre compris entre 0,1 et 2 μm par l'addition d'agents « porogènes » [86, 87]. Ces agents sont un *n*-alkyltrialkoxysilane (C_{18}TMS) ou une *n*-alkylamine (C_{16}NH_2). En augmentant la concentration en C_{18}TMS , la surface spécifique et le diamètre moyen des pores augmentent et atteignent respectivement 645 m^2/g et 3,7 nm, pour une concentration en tensioactif égale à $94,5 \cdot 10^{-3}$ M. En utilisant des amines primaires⁷, la surface spécifique obtenue se situe entre 600 et 800 m^2/g et le volume poreux moyen entre 0,4 et 0,8 cm^3/g , dépendant des conditions de synthèse [86, 87]. Les diffractogrammes ne montrent qu'un seul pic de réflexion assez large, prouvant ainsi que les particules ne sont pas aussi bien ordonnées que les matériaux de type MCM-41 ou MCM-48 (cf. Annexe B pour un exemple de diffractogramme d'un matériau de type MCM-41) [30–32].

Toujours basé sur une modification du procédé de Stöber, Grün *et al.* ont synthétisé des particules sphériques de silice mésoporeuse en utilisant comme agent « porogène » des bromures de *n*-alkyltriméthylammonium ($\text{C}_{16}\text{TMABr}$) et des chlorures de *n*-alkylpyridinium ($\text{C}_{16}\text{PyrCl}$) [88, 89]. La surface spécifique de ces nanomatériaux est d'environ 1100 m^2/g et le diamètre des pores de 3,0 nm. Pour les deux agents porogènes, les diffractogrammes obtenus sont proches de ceux retrouvés pour les matériaux de type MCM-41.

Peu après, Pauwels *et al.* [90] ont étudié les propriétés structurales et texturales de ces particules sphériques et les ont comparées à celles des matériaux conventionnels de type MCM-41 [91]. Bien que les propriétés texturales de ces deux matériaux soient similaires ($S_{\text{BET}} \sim 950 \text{ m}^2/\text{g}$ et $D_{\text{BJH}} \sim 2,5 \text{ nm}$), les diffractogrammes montrent des pics de réflexion plus larges aux bas angles pour les particules sphériques, indiquant une diminution de l'ordre à longue distance. Les clichés

7. Rappel : la première synthèse de matériaux mésoporeux utilisant des tensioactifs neutres (HMS) a été réalisée par Tanev *et al.* [36] en 1995.

de microscopie en haute résolution et la diffraction électronique montrent que les pores sont soit arrangés localement de manière hexagonale, soit de symétrie sphérique en partant du centre vers l'extérieur des particules [90].

Afin de mieux comprendre l'origine de ce phénomène, l'effet de l'alcool sur la morphologie et la mésostructure des particules a été étudié en détails [92, 93]. L'augmentation de la concentration en éthanol dans le système TEOS-CTABr-ammoniaque-eau à température ambiante induit une transition de la mésophase hexagonale (MCM-41) vers la mésophase lamellaire (MCM-50) en passant par la mésophase cubique (MCM-48) et en finissant par des particules sphériques dont les pores ne sont pas parallèles mais ont une orientation radiale par rapport aux particules. Pour expliquer une telle succession de phases, il a été avancé que l'éthanol jouait le rôle de co-tensioactif [92, 93]. A faible concentration en alcool, la morphologie des matériaux obtenus n'est que faiblement sphérique. Quand la concentration augmente, l'éthanol va agir comme un co-solvant et former des particules sphériques. Il a donc été suggéré que l'augmentation de la quantité d'alcool modifiait le paramètre d'empilement g du tensioactif et dirigeait la configuration de la mésostructure pendant la synthèse. Des petites valeurs de g stabilisent des surfaces plutôt courbées tels que les MCM-41 ($\frac{1}{3} < g < \frac{1}{2}$), tandis que les plus grandes valeurs stabilisent des structures présentant moins de courbure comme les MCM-48 ($\frac{1}{2} < g < \frac{2}{3}$).

La formation de particules sphériques dont les pores sont arrangés radialement et dont le diffractogramme est proche de celui des matériaux de type MCM-41, rentre en contradiction avec les prédictions données par le paramètre d'empilement g . C'est pourquoi, Lebedev *et al.* se sont attachés à comprendre *comment les pores pouvaient s'arranger radialement* [94]. En utilisant la microscopie électronique en transmission, ils démontrent que les particules sont constituées d'un cœur s'apparentant à un octaèdre tronqué possédant une structure cubique de type MCM-48 et des canaux cylindriques dont la croissance a lieu en surface de l'octaèdre (Figure 1.11).

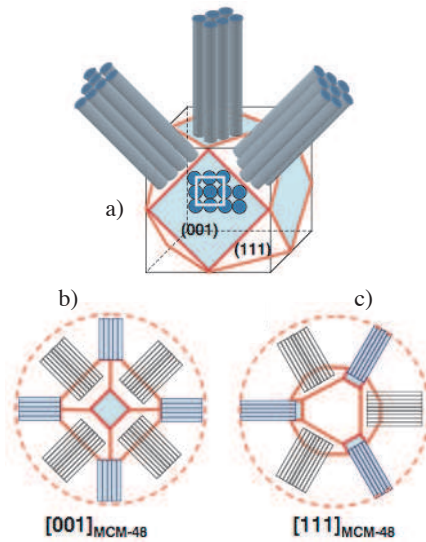


FIGURE 1.11 : (a) Représentation schématique d'une particule sphérique constituée d'un noyau cubique de type MCM-48 et de canaux cylindriques dont la croissance s'est faite de manière épitaxiale sur les faces $\{111\}$ et $\{001\}$. (b) et (c) Projections de la particule suivant les axes $[001]$ et $[111]$ [93].

1.2. Etat de l'art sur les différentes voies de synthèse des MSNs

Basées sur la méthode de Grün *et al.* [88, 89], différentes méthodes ont été développées afin de produire des sphères de silice mésoporeuse ou super-microporeuse dont les caractéristiques physico-chimiques pouvaient être modulées en fonction du rapport silicate/tensioactif, de la longueur de la chaîne alkyle, du temps de réaction, de la concentration en ammoniacque, de la température de réaction ou encore de la source de silice [86, 87, 89, 95–98]. Schumacher *et al.* ont aussi développé une nouvelle méthode de synthèse pour obtenir des nanosphères de type MCM-48 [99].

A partir de la méthode de Grün *et al.* [88, 89], **Cai *et al.*** ont réussi à contrôler la morphologie des particules en utilisant comme catalyseur l'ammoniacque ou la soude [100]. Ils obtiennent des nanoparticules dont la mésosstructure est arrangée de manière hexagonale et dont les morphologies sont soit des sphères (~ 100 nm de diamètre), soit des bâtonnets ($\sim 700 - 1000$ nm sur la longueur, et $\sim 300 - 500$ nm sur la largeur). De par sa facilité de mise en œuvre, cette méthode fait partie des synthèses de la littérature les plus reprises. **Elle constituera d'ailleurs la base de notre approche expérimentale.** Peu après, Mou *et al.* ont développé une autre méthode où les cinétiques d'hydrolyse et de condensation pouvaient être parfaitement contrôlées par dilution de la solution de CTAB, de TEOS et d'acide nitrique HNO_3 vers une solution contenant soit de l'ammoniacque, soit un mélange d'hydroxyde de sodium et d'acide acétique. Au final, ils obtiennent soit des bâtonnets qui présentent une mésosstructure de type MCM-41, soit des nanosphères dont la structure est désordonnée [101, 102].

En utilisant la technique de pulvérisation-séchage⁸ ou auto-assemblage induit par évaporation (EISA), Lu *et al.* ont démontré qu'il était possible d'obtenir des nanoparticules mésoporeuses dont la mésosstructure pouvait être lamellaire, cubique ou hexagonale (Figure 1.12(a)) en fonction du tensioactif utilisé. Cette découverte fut le point de départ de nombreux travaux qui ont suivi [103–105].

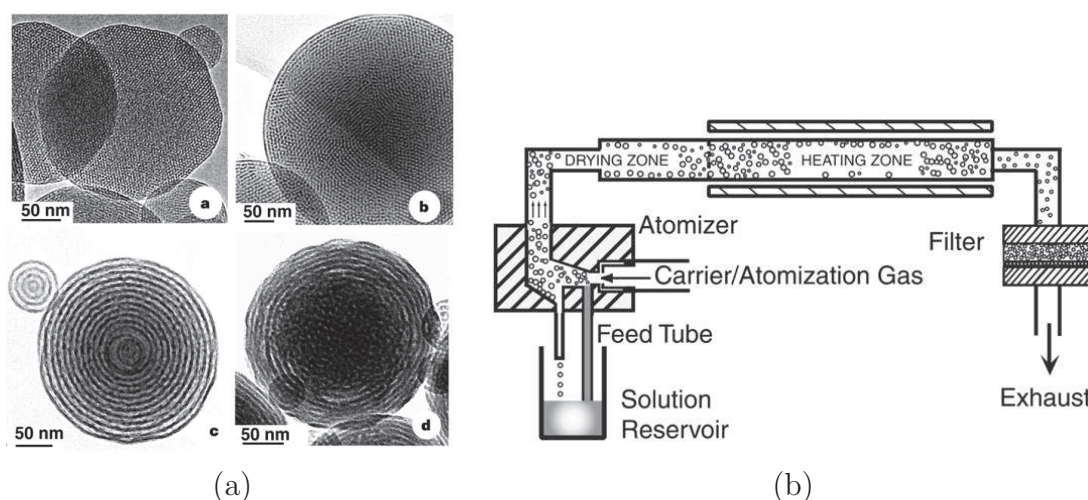


FIGURE 1.12 : (a) Clichés MET des nanoparticules mésoporeuses dont les mésophases sont les suivantes : a) hexagonale, b) cubique, c) vésiculaire et d) vésiculaire avec une phase désordonnée à l'intérieur de la particule. (b) Représentation schématique du réacteur utilisé pour la formation des nanosphères mésoporeuses par EISA. D'après [47]

8. pulvérisation-séchage = spray-drying.

Dans cette dernière approche, un sol, généralement composé d'un tensioactif cationique (CTAB) ou non-ionique (Brij-56 ; Brij-58) et/ou d'un copolymère triblocs (le P123, PEO₂₀–PPO₇₀–PEO₂₀), d'un précurseur de silice (TEOS), d'un solvant (*i*PrOH, éthanol) et de l'eau en milieu acide est atomisé dans une chambre de séchage (Figure 1.12b). Le produit est ensuite récupéré sur un filtre Teflon® ou directement sur une grille de microscopie. Ça n'est que très récemment que Alonso *et al.* ont démontré en utilisant la RMN du solide ²⁹Si et du ¹H que le mécanisme de formation induisait :

- une fragmentation des gouttelettes causée par l'évaporation du solvant ;
- un processus d'agrégation et d'auto-assemblage des molécules de tensioactif avec les oxo-oligomères ;
- un réarrangement par propagation de la mésophase résultante pour former une structure ordonnée.

Dans les mêmes années, Fowler *et al.* ont développé une procédure plus simple permettant l'obtention d'une suspension de MSNs de type MCM-41 de petits diamètres et monodisperses en taille [106]. Cette procédure implique une dilution puis une neutralisation rapide au niveau du sol, de l'hydrolyse-polycondensation du TEOS effectuée en milieu basique (NaOH) et en présence de CTAB [106, 107]. Le temps entre la dilution et la neutralisation contrôle la taille des particules (la croissance est privilégiée par rapport à la nucléation dès lors que l'on dilue). Par exemple, si le temps entre la dilution et la neutralisation est de 60 secondes, des particules avec un diamètre de 23 nm sont obtenues (contre 100 nm au bout de 220 secondes).

Le mécanisme de formation a été étudié par Sadisavan *et al.* (Figure 1.13) [107]. Dès les premiers instants, l'hydrolyse du TEOS mène à la formation des espèces silicates hydro-solubles qui interagissent avec la tête cationique des micelles de CTAB. Ainsi, des bâtonnets de micelles hybrides (organique/inorganique) de l'ordre de 9 nm de long et 5 nm de large sont formés (Figure 1.13(a)). Ensuite, ces particules primitives s'agrègent en nanoparticules sphériques désordonnées de moins de 50 nm de diamètre (Figure 1.13(b)). Une réorganisation interne en phase nématique (orientation parallèle de la mésostructure, silice plus tensioactif) conduit alors à une particule mono-domaine en forme d'ellipse de l'ordre de 60 nm (Figure 1.13(c)). Après élongation du système tensioactif-silice, des nanoparticules mésostructurées sont obtenues (Figure 1.13(d)). Cette méthode est particulièrement avantageuse puisqu'elle est simple et facile à mettre en œuvre. Cependant, les rendements obtenus sont faibles et il est difficile de purifier les nanoparticules car les volumes finaux sont importants. Par conséquent, d'autres stratégies ont été développées.

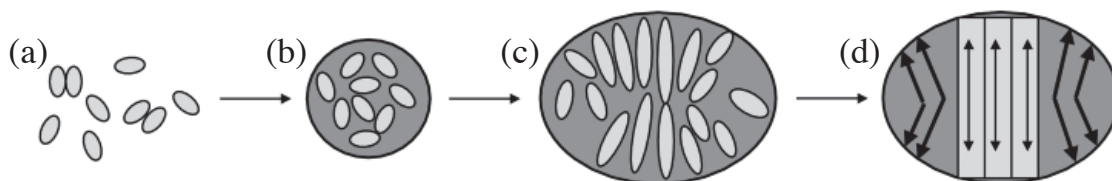


FIGURE 1.13 : Mécanisme de formation des MSNs établi par Sadisavan *et al.* [107].

Par exemple, Möller *et al.* ont remplacé la soude par la triéthanolamine (TEA) qui, lorsqu'elle est mise en présence du TEOS, forme un complexe silatrane et évite ainsi une condensation trop rapide [108–110]. En faisant varier le temps de synthèse et la température, des suspensions concentrées de particules non agglomérées et possédant une taille pouvant aller de 50 à 100 nm sont obtenues. Ces particules présentent une structure vermiculaire dont les pores croissent du centre de la particule vers sa périphérie. Pan *et al.* ont démontré très récemment qu'une augmentation des quantités ajoutées de TEA permettait de diminuer la taille des particules, ce qui confirme le rôle de la TEA comme agent complexant et inhibiteur de la croissance des particules mésoporeuses de silice [111]. Le mécanisme de formation des nanoparticules mésoporeuses préparées à partir du système H_2O - CTAB - TEA - TMOS a été étudié en temps réel par diffusion de neutrons aux petites angles [112]. Le mécanisme proposé est constitué de deux étapes (Figure 1.14) : (i) adsorption des oligomères de silice sur la surface des micelles, ce qui diminue les répulsions intermicellaires et produit une rapide agrégation, (ii) remplissage lent des espaces des agrégats de micelle/silice avec la condensation des espèces.

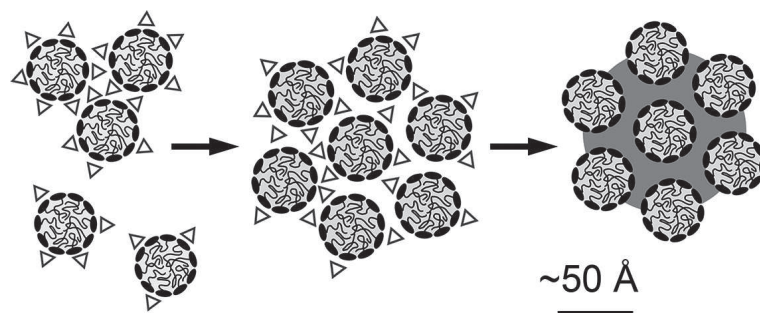


FIGURE 1.14 : Mécanisme de formation des nanoparticules mésoporeuses préparées à partir du système H_2O - CTAB - TEA - TMOS [112].

En utilisant ce même principe de synthèse, Urata *et al.* ont démontré tout récemment qu'il est possible d'ajuster la taille des particules de 20 à 80 nm *via* l'utilisation de différents tétraalkoxysilanes ($Si(OR)_4$, $R = Me, Et, Pr$ et Bu), le plus petit diamètre étant corrélé à la plus petite longueur de chaîne (TMOS) [113]. Dans les mêmes années, Ma *et al.* ont réussi à diminuer la taille des particules jusqu'à obtenir un diamètre de 10 nm. Pour cela, un PEG-silane est utilisé pour limiter la croissance des particules [114].

Récemment, Lu *et al.* ont développé une autre voie de synthèse de MSNs en séparant les étapes de nucléation et de croissance *via* une pré-hydrolyse du TEOS en milieu alcoolique. En ajustant le pH d'une solution d'ammoniaque, ils montrent que la taille des particules passent de 30 à 280 nm lorsque le pH passe de 10,86 à 11,52 [115]. A contrario, Qiao *et al.* montrent que la taille des particules augmente de 30 nm à 85 nm lorsque le pH diminue de 10,0 à 6,0 [116]. Chiang *et al.* ont utilisé la méthode de Taguchi⁹ afin d'étudier l'influence du pH du milieu réactionnel (**incrément très large : pH = 6, 10 et 13**), de la concentration en TEOS et du temps de réaction sur la taille et la structure des MSNs. Ils concluent que le pH

9. Inventée par Gen'ichi Taguchi, cette méthode statistique est utilisée pour réaliser des plans d'expérience [117].

est le paramètre de première importance (57%), suivi du temps de réaction (29%) et de la concentration en TEOS (13%) [118]. Très récemment, une nouvelle méthode de synthèse de MSNs a été développée par Yu *et al.*. Cette approche implique l'addition d'acétate de sodium trihydraté (CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$). Les propriétés structurales et morphologiques des MSNs peuvent être ajustées par un traitement hydrothermal à 100°C - 130°C en milieu basique ou acide. Ces particules sont redispersables même après élimination de l'agent structurant par calcination mais ne présentent pas de structure ordonnée [119].

La préparation en milieu acide de matériaux mésoporeux sous la forme de nanoparticules a aussi été étudié en utilisant une solution aqueuse composée d'un tensioactif cationique et d'un copolymère triblocs. Par exemple, Suzuki *et al.* ont développé une nouvelle approche permettant la synthèse de MSNs (20 - 50 nm) possédant une arrangement hexagonal des pores [120]. Cette nouvelle voie implique la dissolution d'un tensioactif cationique qui agit comme agent structurant (CTACl) définissant la mésostructure, et d'un copolymère triblocs, le F127 ((PEO)₁₀₆-(PPO)₇₀-(PEO)₁₀₆) limitant la croissance des particules de silice dans une solution d'acide chlorhydrique, suivi d'un ajustement du pH à 2 avant l'addition du TEOS. Berggren *et al.* ont également préparé des particules mésoporeuses en milieu acide et en utilisant comme seul agent structurant un copolymère triblocs de type Pluronic[®], le P123 ((PEO)₂₀-(PPO)₇₀-(PEO)₂₀). Le silicate de sodium a été utilisé comme source de silice après ajustement du pH à 3 avec une résine échangeuse d'ions, permettant ainsi d'avoir une force ionique faible, ce qui permet de diminuer la taille des particules. Cette dernière peut être ajusté de 90 à 250 nm en faisant varier les quantités d'eau et de sels, et le ratio massique tensioactif/silice.

Encore plus récemment, Chen *et al.* ont utilisé un tensioactif de type « gémini » comme agent structurant [121]. Les tensioactifs « gémini » ont la particularité d'être composés de deux amphiphiles connectés au niveau de leurs têtes polaires par un espaceur de nature variable [122]. La Concentration Micellaire Critique (CMC) de ces tensioactifs est en général une à deux fois plus petite que les tensioactifs monovalents. En faisant varier les conditions initiales de synthèse comme la composition molaire des réactifs, le pH, la température, la présence ou non d'un co-solvant, Chen *et al.* ont réussi à synthétiser des nanoparticules mésoporeuses dont le diamètre pouvait être ajusté de 120 à 490 nm avec des pores ordonnés radialement. Dans leur conditions spécifiques de synthèse, la taille des particules augmente de 350 à 490 nm lorsque la concentration en soude augmente de 8,9 à 22,2 mM.

Des nanoparticules de type MCM-48 ont également été synthétisées en utilisant le système CTAB - Pluronic[®] F127 - TEOS - NH_4OH [123]. Kim *et al.* ont démontré que la transition entre la phase hexagonale 2D ($P6mm$) et la phase cubique 3D ($Ia3d$) pouvait être contrôlée par l'agitation. La taille des particules est contrôlée par la concentration en Pluronic[®] F127 [123].

Les conditions expérimentales des synthèses les plus représentatives sont résumées dans le Tableau 1.2.

TABLEAU 1.2 : *Tableau récapitulatif des méthodes de synthèse menant à des MSNs.*

Tensioactif	Source silice	Structure	^a d _{MET} (nm)	^b d _{DDL} (nm)	Condition pH	Stratégie	Référence
C ₁₆ TAB	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	60-100	-	Basique (NaOH)	Dilution puis neutralisation	Fowler <i>et al.</i> , 2001 [106]
C ₁₆ TAB	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	100-2500	-	Basique (NaOH)	Conditions diluées	Cai <i>et al.</i> , 2001 [100]
C ₁₆ TAB, <i>n</i> -dodecylamine	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	60-740	-	Basique (NH ₄ OH)	Conditions diluées et co-solvant	Nooney <i>et al.</i> , 2002 [97]
C ₁₆ TAB	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	200-250	-	Basique (NaOH)	Conditions diluées	Lai <i>et al.</i> , 2003 [124]
C ₁₆ TAC	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	20-50	-	Basique (NH ₄ OH)	Contrôle de la croissance par F127	Suzuki <i>et al.</i> , 2004 [120]
C _n TACl (n =14, 16, 18)	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	150-860	-	Basique (NH ₄ OH)	Rapport co-solvant/eau	Yano <i>et al.</i> , 2004 [96]
C ₁₆ TACl	TEOS	Vermiculaire	45-150	100-190 (H ₂ O ou EtOH)	Basique (TEA)	Rapport TEOS/TEA	Möller <i>et al.</i> , 2007 [110]
Pluronic P123	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	50-300	88-250 (H ₂ O)	Acide (HCl)	Quantité H ₂ O	Berggren <i>et al.</i> , 2008 [125]
C ₁₆ TAB	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	30-280	100-280 (H ₂ O)	Basique (NH ₄ OH)	Conditions diluées et ajustement du pH	Lu <i>et al.</i> , 2009 [115]
C ₁₆ TAB	TEOS	Désordonnée	100-300	100-300 (H ₂ O)	Neutre	Propanetriol comme co-tensioactif et co-solvant	He <i>et al.</i> , 2009 [126]
C ₁₆ TAB	TEOS	Désordonnée	<20	30 (H ₂ O)	Basique (TEA)	Rapport C ₁₆ TAB/Si	Urata <i>et al.</i> , 2009 [127]
C ₁₆ TAB	TEOS et ^c APTES	Cubique 3D ordonnée	100-220	100-220 (H ₂ O)	Basique (NH ₄ OH)	Addition agent gonflant	Suteewong <i>et al.</i> , 2011 [128]
C ₁₆ TAB	TEOS	Hexagonale 2D ordonnée	42	60 (H ₂ O, ^d PBS, milieu de culture)	Basique (NH ₄ OH)	Conditions diluées et modification PEG	Lin <i>et al.</i> , 2011 [129]

^ad_{MET} : Taille obtenue par Microscopie Electronique en Transmission (MET); ^bd_{DDL} : Taille obtenue en Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL);

^cAPTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane; ^dPBS : Tampon Phosphate Salin. D'après [16].

1.3 Modification de surface des MSNs

Depuis 2001, date à laquelle Vallet-Regí *et al.* ont pour la première fois proposé d'utiliser les matériaux mésoporeux de silice comme vecteur de médicaments, de nombreuses études ont été menées afin de comprendre *quels sont les facteurs qui contrôlent les cinétiques d'encapsulation et de libération* [14, 130–132]. A l'heure actuelle, il est bien admis par la communauté scientifique que ces facteurs sont la taille des pores [133], la tortuosité [134], le volume poreux [135], la morphologie [136] ou encore la chimie de surface des matériaux [137–139]. Par exemple, la fonctionnalisation de la surface des canaux par des groupements hydrophobes s'avère être efficace pour l'encapsulation d'anticancéreux lipophiles [132, 140, 141]. Le taux de chargement du vecteur dépend aussi fortement du solvant utilisé ainsi que de la méthode d'encapsulation [142–145].

Basée sur les méthodes traditionnellement utilisées pour les matériaux mésoporeux siliciques, la fonctionnalisation des MSNs a été particulièrement développée ces dernières années. Elle peut être accomplie suivant trois voies principales : par greffage successif des composés organiques sur la matrice de silice (greffage post-synthèse), par réaction simultanée entre le précurseur silicique et un composé organique silanisé (fonctionnalisation par co-condensation) ou encore par l'utilisation de précurseurs de type silsesquioxanes (PMOS¹⁰) [69, 146, 147]. Avant de développer ces trois voies de fonctionnalisation, il convient de présenter tout d'abord les propriétés de surface des MSNs.

1.3.1 Propriétés de surface des MSNs

La surface d'un oxyde tel que la silice SiO₂ est constituée de deux groupements qui possèdent des réactivités très différentes, à savoir les groupements silanols Si-OH et les groupements siloxanes Si-O-Si (Figure 1.15). Ces derniers, hydrophobes et très peu réactifs, sont générés par condensation de deux groupements silanols voisins en libérant une molécule d'eau : c'est la **déshydroxylation**. Cette réaction est lente et a lieu de 450 °C jusqu'à 1100 °C. Elle ne doit pas être confondue avec la déshydratation qui a lieu jusqu'à 120 °C pour les molécules d'eau faiblement liées (eau physisorbée) et à partir de 200 °C pour les molécules d'eau en interaction forte (eau chimisorbée) [148]. Les groupements silanols sont quant à eux très réactifs et de leur taux va directement dépendre les capacités d'adsorption ou de post-modification du matériau. Il existe trois sortes de groupements silanols :

- les groupements **silanols géminaux**, où deux fonctions hydroxyles sont liées à un même atome de silicium. Ils sont généralement minoritaires [149] ;
- les groupements **silanols pontés ou vicinaux**, où deux fonctions hydroxyles liées à des atomes de silicium différents sont suffisamment proches pour interagir par formation de liaison hydrogène ;

10. PMOS : *Periodic Mesoporous Organosilicas*

1.3. Modification de surface des MSNs

- les groupements **silanols isolés** pour lesquels l'atome de silicium forme trois liaisons covalentes avec des atomes d'oxygène du coeur du matériau et une quatrième avec un groupement hydroxyle de surface. Parmi les trois types de groupements silanols, ces derniers sont les plus réactifs [150].

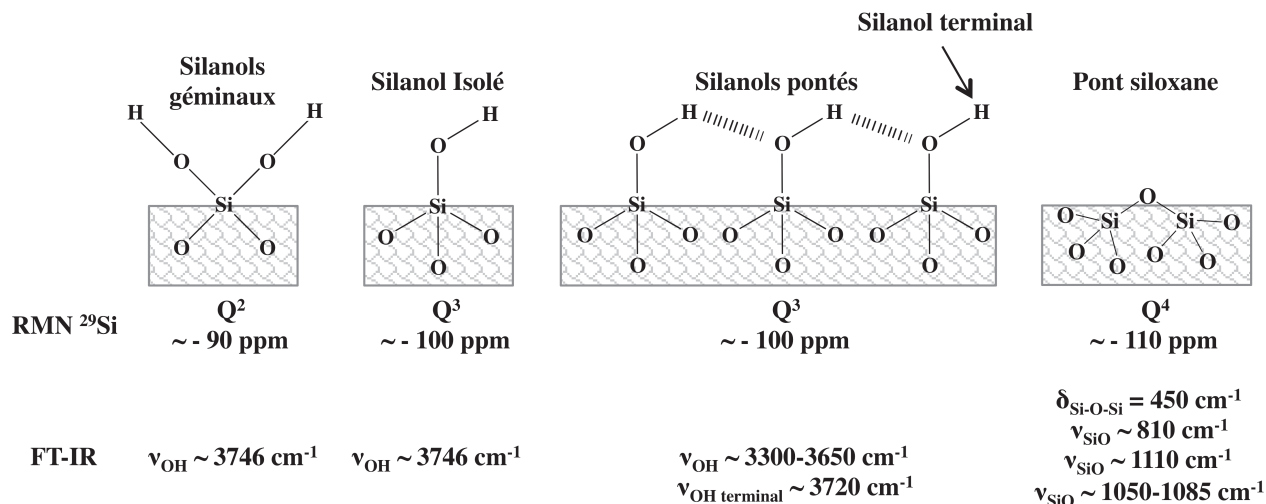


FIGURE 1.15 : Représentation schématique et données caractéristiques correspondantes des déplacements chimiques en spectroscopie RMN ^{29}Si et des bandes en spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (FT-IR) des différents groupements de surface de la silice. En spectroscopie RMN ^{29}Si , les différents atomes de silicium de la silice sont désignés par la terminologie Q^n , où n représente le nombre d'oxygènes pontants liés à l'atome central de silicium.

Afin de caractériser les matériaux siliciques, on utilise couramment deux techniques spectroscopiques complémentaires : la spectroscopie RMN ^{29}Si du solide (Annexe E.1) et la spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (FT-IR, Annexe E.2). Comme le montre la Figure 1.15, la spectroscopie RMN ^{29}Si du solide [151–153] permet de discerner les différents types d'atomes de silicium constituant la silice. La spectroscopie FT-IR [154–156] permet de différencier les silanols pontés des silanols isolés ou géminaux (Figure 1.15). En spectroscopie FT-IR, la région entre 3300 et 3750 cm^{-1} est la plus souvent étudiée car elle contient les vibrations d'élongation des différents silanols de surface (Figure 1.15). Les silanols géminaux ou isolés ont une bande d'absorption bien définie à 3746 cm^{-1} alors que pour les silanols pontés, la bande d'absorption est très large et son maximum est situé à environ 3550 cm^{-1} [154–156]. Parmi les silanols pontés, les silanols terminaux se distinguent par l'apparition d'une bande d'absorption à 3720 cm^{-1} [156]. En pratique, l'interprétation des spectres infrarouge entre 3300 et 3750 cm^{-1} est très souvent délicate à cause des interactions entre les silanols et les molécules d'eau adsorbées, ce qui se traduit par une superposition des absorptions caractéristiques. La spectroscopie Raman est aussi une technique qui peut être utilisée afin de caractériser les silices amorphes [157–160]. Nous y aurons très largement recours afin de caractériser nos silices mésoporeuses (voir section 2.1.5.3).

L'Analyse ThermoGravimétrique (ATG) et la spectroscopie RMN ^{29}Si du solide permettent également d'évaluer quantitativement la quantité de groupement silanol [161, 162]. Des méthodes chimiques de quantification existent et impliquent des composés comme le trichlorure de bore,

le tétrachlorure de titane, le diazométhane, LiAlH_4 ou différents organosilanes [163, 164]. Ces techniques sont en général limitées à une détection de $2,5 \text{ OH/nm}^2$ du fait des encombrements stériques de ces différents groupes. Les titrages *Karl Fisher* [165], acido-basique [166] et la deutération par échange à l'eau lourde [167] peuvent être aussi utilisés. La concentration en groupements hydroxyles en surface de la silice varie entre 2 et 8 OH/nm^2 [168, 169]. Globalement, on retrouve une densité de groupements hydroxyles plus élevée pour les matériaux non poreux (de 5 à 8 OH/nm^2) que pour les matériaux poreux (de 1 à 3 OH/nm^2 [154]). Dans le cas des matériaux mésoporeux, cette valeur dépend du mode de libération de l'agent structurant et peut varier selon les traitements thermiques subits par les matériaux [154, 161, 170].

1.3.2 Greffage post-synthèse

Cette technique de fonctionnalisation consiste à attacher de manière covalente la molécule organique à partir des réactions entre les groupements silanols des (nano)matériaux et des silanes de type organosilanes $\text{SiR}(\text{OR}')_3$, chlorosilanes $\text{R}_n\text{SiCl}_{3-n}$ ou silazanes $\text{H}_n\text{N}(\text{SiR}_3)_{2-n}$ (Figure 1.16). Parmi les organosilanes, les composés porteurs des groupements éthoxy et méthoxy sont les plus utilisés en raison de leur grande réactivité. Les réactions types dans le cas d'un triéthoxysilane peuvent être décrites *via* les équations suivantes :

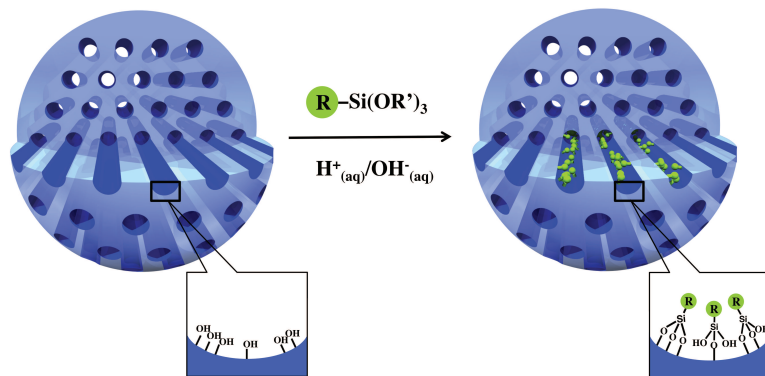
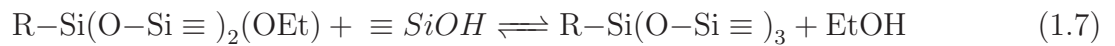
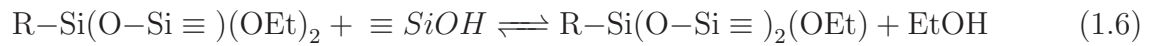
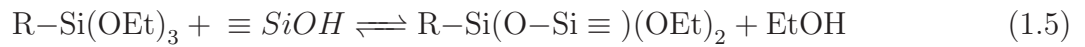


FIGURE 1.16 : Représentation schématique de la fonctionnalisation des groupements silanols par fonctionnalisation post-synthèse. Schéma inspiré de [146].

Avec cette méthode, de nombreux groupements organiques R peuvent être introduits du moment que les conditions de greffage n'engendrent pas leur dégradation ou une altération de leur réactivité. Les groupements les plus fréquemment utilisés sont des fonctions alkyl

(CH₃, CH₂–CH₃), amino (–NH), cyano (–CN) et mercapto (–SH) car ils sont commercialement disponibles. Dans le cas contraire, plusieurs étapes sont nécessaires et impliquent une première modification en général avec des groupements aminés ou chlorés, ceux-ci jouant le rôle de sites d’ancrage [171]. A partir de cette méthode, des gels de silice et des matériaux mésoporeux ont été modifiés par des groupements amide, imine, dithiocarbamate, des hétérocycles, voire même des dendrimères [150, 172].

L’avantage de la méthode post-synthèse est qu’elle n’altère pas la mésostructure bien qu’une réduction de la porosité ait souvent lieu. L’un des aspects les plus attractifs de cette démarche est qu’il est possible d’introduire deux groupements fonctionnels différents (en jouant sur l’extraction) qui peuvent se trouver simultanément soit à la surface externe du matériau, soit à l’intérieur des canaux [173].

Dans ce procédé de fonctionnalisation par greffage, le contrôle de la concentration des groupements organiques introduits et leur distribution sont liés aux nombres de groupements silanol présents à la surface de la silice ainsi qu’à leur accessibilité. Le taux de fonctionnalisation dépend alors de la réactivité des précurseurs employés ainsi que de la limitation diffusionnelle et de l’encombrement stérique du matériau. En conséquence, si les organosilanes sont préférentiellement greffés à l’entrée des canaux durant les premières étapes du greffage, la diffusion des autres groupements fonctionnels à l’intérieur des pores peut être dans ce cas très fortement perturbée. Il en résulte une distribution non-homogène de l’espèce organique ainsi qu’un faible taux d’occupation [15, 131, 174].

D’un point de vue expérimental, la méthode de greffage post-synthèse implique de travailler en l’absence complète d’eau afin d’éviter la polymérisation anarchique de l’organosilane. Ceci implique un pré-traitement thermique ainsi qu’une mise en solution du matériau dans un solvant anhydre et sous atmosphère inerte. Cette méthode de fonctionnalisation a fait l’objet de très nombreuses revues [175–180]. Nous ne la détaillerons pas plus puisqu’elle n’a été utilisée qu’indirectement dans le cadre de cette thèse (section 3.2). De plus, cette méthode de greffage est très peu utilisée pour la fonctionnalisation des nanoparticules mésoporeuses de silice car les nombreux séchages qu’elle implique, induisent une mauvaise re-dispersion des nano-objets, ce qui n’est pas acceptable pour des applications biomédicales [181].

1.3.3 Fonctionnalisation *in situ* par co-condensation

Une méthode alternative pour synthétiser des matériaux hybrides est la fonctionnalisation par co-condensation. Cette approche implique une réaction entre un organosilane SiR(OR’)₃ et un précurseur silicique Si(OR’)₄ en présence d’agents structurants [182–186]. Le précurseur le plus utilisé est le tétraéthoxysilane (R’ = groupement éthyle). Les groupements organiques sont ancrés de manière covalente aux murs (Figure 1.17).

Contrairement à la fonctionnalisation par greffage post-synthèse, cette méthode directe permet l’introduction des groupements organiques pendant la constitution du réseau silicaté.

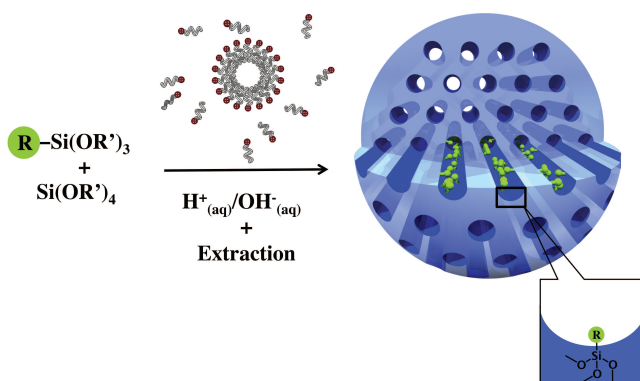


FIGURE 1.17 : Représentation schématique de la fonctionnalisation par co-condensation en présence de tensioactifs. Schéma inspiré de [146].

De plus, elle présente l'avantage de limiter l'obturation des pores, et donc d'assurer *a priori* une répartition plus homogène des fonctions organiques [174]. Ceci est particulièrement vrai lorsque le groupement organique rentre en interaction avec le tensioactif [187]. Cette voie permet aussi de mieux contrôler la quantité de groupements introduits par modulation du rapport organosilane/précurseur silicique [188]. Toutefois, la qualité de la mésostructure obtenue dépend généralement du taux de fonctionnalisation et on peut déplorer un ordre moins bien défini. En particulier, une concentration limite en précurseurs organosilaniques existe au-delà de laquelle le matériau peut être totalement désordonné [189]. D'autre part, la quantité de fonctions introduites est en général plus faible qu'attendue à cause d'une homocondensation parasite. Enfin, le volume poreux est en général plus faible que celui obtenu pour les solides obtenus par post-greffage, et la calcination (permettant l'élimination de l'agent structurant) est à proscrire de manière à ne pas détruire la fonctionnalisation.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de fonctionnaliser les nanoparticules en utilisant cette méthode car elle permet, à faible taux de fonctionnalisation, une distribution plus uniforme des groupements organiques dans les canaux tout en préservant la mésostructure, ce qui peut permettre (par rapport à la méthode post-synthèse) un taux de chargement du vecteur plus important et un meilleur contrôle de la libération [14, 15, 131]. Les études portant sur la fonctionnalisation des nanoparticules mésoporeuses de silice par co-condensation étant très nombreuses [12, 170, 181, 190–193], nous détaillerons uniquement les articles les plus pertinents dans la partie discussion des résultats (voir paragraphe 3.1.2).

1.3.4 Fonctionnalisation par des organosilanes bis- et multi-silylés : synthèse d'organosilicates mésoporeux périodiques (PMOs)

La synthèse de matériaux hybrides organiques-inorganiques par réaction d'hydrolyse et de condensation de précurseurs de type silsesquioxane $(R'O)_3Si-R-Si(OR')_3$ est depuis très longtemps connue en chimie des sols-gels [194, 195]. En l'absence de tensioactif, cette méthode conduit à la formation de matériaux appelés polysilsesquioxanes. Dès lors qu'un agent structurant

1.4. Greffage de polymères à la surface des MSNs : stabilité colloïdale en milieu physiologique

est ajouté au milieu réactionnel, cela conduit à des matériaux hybrides mésoporeux périodiques dont les groupements organiques sont, non plus distribués à la surface, mais directement incorporés dans le réseau tridimensionnel de la silice grâce à la formation de deux ou plusieurs liaisons covalentes au sein du matériau (Figure 1.18). Un état de l'art très complet relatif à la méthode de préparation de ces matériaux a été publié par Hoffmann *et al.* en 2006 [69].

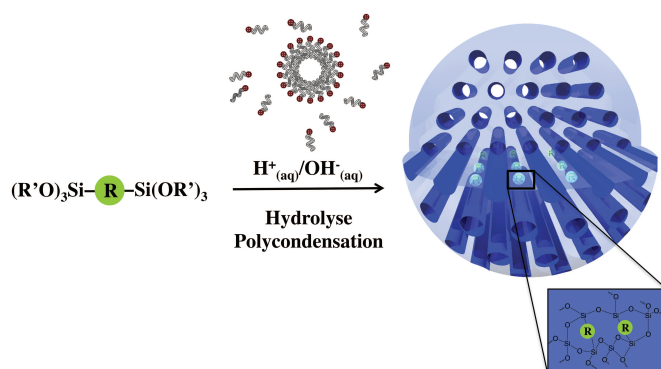


FIGURE 1.18 : Fonctionnalisation de type PMOS. Schéma inspiré de [146].

Les aérogels ou les xérogels obtenus présentent des surfaces spécifiques très élevées (jusqu'à 1800 m²/g) et une grande stabilité thermique, mais le système poreux est très désordonné et la distribution de pores très large [69]. A l'heure actuelle, ces matériaux sont extrêmement sollicités, du fait qu'ils réunissent à eux seuls les propriétés d'une charpente inorganique associée à la réactivité chimique des groupements introduits. Leurs applications sont très nombreuses dans les domaines de la catalyse, de la chromatographie, ou encore de l'électronique. A notre connaissance, cette méthode n'a pas été appliquée à la fonctionnalisation de nanoparticules mésoporeuses de silice.

1.4 Greffage de polymères à la surface des MSNs : stabilité colloïdale en milieu physiologique

Pour les applications biomédicales visées, l'agglomération des nanoparticules en milieu physiologique est l'un des principaux obstacles qui doit être surmonté. En effet, la déstabilisation des nanoparticules peut mener à une accumulation néfaste de nanoparticules dans les organes vitaux [196]. Les milieux physiologiques, comme le plasma sanguin, contiennent une grande quantité de sels (Tableau 1.3) et possèdent une force ionique élevée ($I = 0,15$ M) ainsi qu'un pH d'environ 7,4 à 37 °C. Après un bref rappel sur la notion de stabilité colloïdale, nous exposons dans la partie suivante quelques stratégies visant à améliorer la dispersion des nanoparticules en milieu physiologique.

TABLEAU 1.3 : Concentrations ioniques du plasma sanguin humain. D'après [197].

Ions	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻
Concentration (mM)	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5

1.4.1 Stabilité colloïdale : théorie DLVO

La stabilité d'une suspension colloïdale, déterminée par la balance entre les forces répulsives et attractives, est décrite par la théorie Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) [198, 199]. Grâce à un bilan des forces agissant sur les particules, il est possible de déterminer la hauteur de la barrière énergétique permettant d'éviter l'état d'agrégation. Les interactions colloïdales sont particulièrement importantes pour les petites particules car elles peuvent l'emporter sur d'autres forces extérieures telles que la gravité et le champ magnétique. Ainsi, les forces intervenant dans la théorie DLVO sont uniquement de deux types : les forces de Van der Waals (attractives), qui résultent des fluctuations dipolaires au niveau moléculaire et ne dépendent que de la nature des matériaux en présence, et les forces répulsives, qui sont dues à la présence de charges électrostatiques en surface.

Si l'on considère deux particules sphériques identiques de rayon r , dont les surfaces sont distantes de H et dont la distance centre à centre R est égale à $H + 2r$, l'énergie potentielle d'attraction de Van der Waals entre ces deux particules est déterminée par l'équation suivante [200] :

$$V_A = -\frac{\mathcal{A}}{6} \left(\frac{2r^2}{R^2 - 4r^2} + \frac{2r^2}{R^2} + \ln \frac{R^2 - 4r^2}{R^2} \right) \quad (1.8)$$

où \mathcal{A} est la constante effective de Hamaker. Cette énergie potentielle V_A est en première approximation insensible aux conditions physico-chimiques et ne dépend pas de la concentration en électrolyte.

L'énergie potentielle de répulsion des forces répulsives, dans les cas limites de potentiel et charge constants, pour de faibles potentiels de surface et pour des distances d'approche assez grandes ($H \gg \kappa^{-1}$), s'écrit [201] :

$$V_R \approx 2\pi\epsilon r \psi_d^2 \exp(-\kappa H) \quad (1.9)$$

où ϵ est la permittivité du milieu, κ^{-1} la longueur de Debye et ψ_d le potentiel électrostatique qui peut être assimilé au potentiel zêta. Au regard de l'éq. (1.9), l'énergie potentielle de répulsion dépend du pH à travers ψ_d et de la force ionique à travers la longueur de Debye κ^{-1} . Selon la théorie DLVO, l'énergie totale du système V_T est la somme des énergies potentielles des forces attractives, V_A et répulsives, V_R :

$$V_T = V_A + V_R \quad (1.10)$$

En représentant cette énergie totale en fonction de la distance interparticulaire H , on obtient le profil d'énergie potentielle représenté sur la Figure 1.19. Islam *et al.* ont décrit le comportement de la suspension en fonction de la distance moyenne entre les particules. Dans la zone A ($H > 100$ nm), les particules sont dispersées et n'interagissent pas entre elles. En zone B ($H \sim 60$ nm), les particules se rapprochent et un minimum secondaire apparaît à cause d'une très légère domination des forces de Van der Waals. Lorsque les particules sont en zone

1.4. Greffage de polymères à la surface des MSNs : stabilité colloïdale en milieu physiologique

C ($H \sim 20$ nm), les forces répulsives dominent et une barrière de potentiel existe. En zone D, les particules sont fortement agrégées et de manière irréversible. Pour finir, quand $H < 1$ nm, l'énergie potentielle tend vers l'infini car les forces de Van der Waals deviennent répulsives.

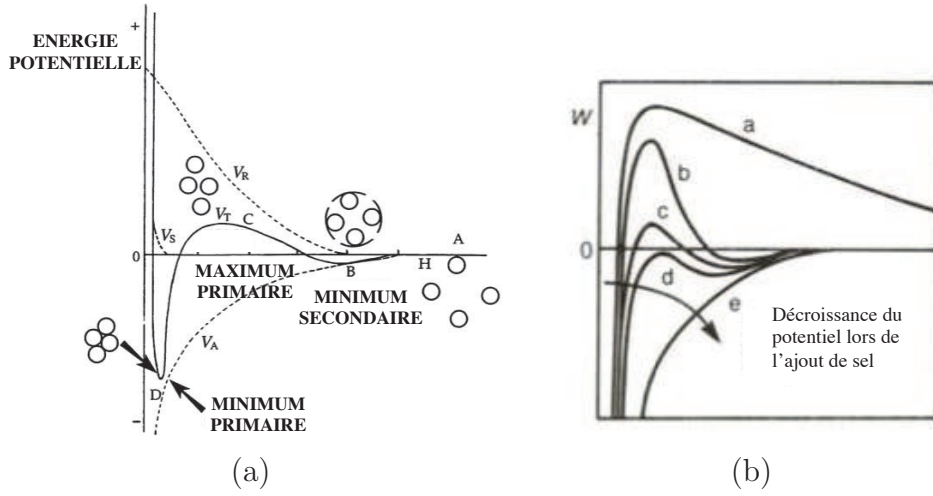


FIGURE 1.19 : Diagramme d'énergie potentielle en fonction de la distance interparticulaire (a) et évolution du diagramme d'énergie potentielle lors de l'ajout de sel (b). Référence : [202, 203].

La hauteur de la barrière d'énergie potentielle totale est un paramètre important dans l'étude de la stabilité des suspensions colloïdales. En effet, si l'énergie cinétique des particules est supérieure à cette barrière de potentiel, alors les particules seront irréversiblement agrégées. La hauteur de cette barrière dépend principalement de la concentration et de la charge de l'électrolyte (*via* la distance de Debye κ^{-1}), du potentiel zêta ζ (donc du pH) et de la nature du solvant (*via* la constante de Hamaker \mathcal{A}).

Une diminution de la contribution répulsive et/ou une diminution du potentiel de surface peut être provoquée par une augmentation de la force ionique de l'électrolyte et/ou par une diminution du potentiel de surface des particules (avec le pH) et va entraîner une déstabilisation de la suspension particulaire comme l'illustre la Figure 1.19 (profils a à e). A faible force ionique, la répulsion prédomine et le minimum primaire n'est pas accessible ; la suspension est stable (profil a). Au fur et à mesure que la force ionique augmente et/ou que le potentiel de surface des particules diminue, la barrière d'énergie potentielle diminue jusqu'au moment où les particules peuvent la passer et « tomber » dans le minimum primaire ; la suspension est instable (profil e).

La concentration en sel à partir de laquelle la barrière d'énergie potentielle devient nulle correspond à la Concentration Critique de Coagulation (*ccc*) et est définie selon la théorie DLVO par l'équation suivante [204] :

$$ccc = 3,9 \times 10^{-39} \frac{\gamma^4}{\mathcal{A}^2 z^6} \quad (1.11)$$

où $\gamma = \tanh(ze\psi_d/4k_B T)$ avec e la charge électrique ($1,6 \times 10^{-19}$ C), $k_B T$ l'énergie thermique ($4,11 \times 10^{-21}$ J à 298 K), \mathcal{A} la constante de Hamaker ($\mathcal{A} = 0,83 \times 10^{-20}$ J pour la silice dans l'eau) et z la valence de l'ion ($z = 1$ pour un ion monovalent).

Pour une suspension de nanoparticules de silice de 12 nm de diamètre dont le potentiel zêta est de $\zeta = -30$ mV à pH = 9,8, déstabilisée par une solution de chlorure de sodium, la *ccc* calculée par l'éq. (1.11) est égale à 0,34 mol.L⁻¹ [204]. Toutefois, la théorie DLVO ne s'applique que dans le cas de systèmes dilués et la valeur calculée par cette expression est surévaluée pour des suspensions concentrées de silice.

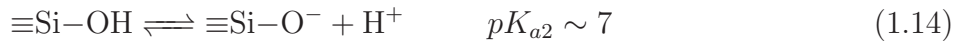
Pour une suspension de nanoparticules de silice de taille comprise entre 5 et 25 nm de concentration donnée à pH = 9, Iler [205] propose l'expression suivante :

$$ccc = 0,26 - 0,005[\text{SiO}_2] - 0,0012(T - 40) \quad (1.12)$$

où *ccc* est exprimée en mol.L⁻¹, [SiO₂] la concentration en silice en g.L⁻¹ et *T* la température en °C. Ainsi, à 25 °C, une suspension contenant 1% en masse de nanoparticules de silice dense commence à s'agréger pour une concentration en chlorure de sodium de 0,227 mol.L⁻¹, tandis qu'une suspension à 3% en masse de silice commence à s'agréger à partir d'une concentration en chlorure de sodium de 0,123 mol.L⁻¹, soit une concentration en sels proche du milieu physiologique (0,15 M).

1.4.2 Origines des charges de surface des nanoparticules de silice

En solution aqueuse, les groupements silanols de surface des nanoparticules de silice s'ionisent selon les équilibres suivants [206] :



En fonction du pH, l'état de protonation des groupements hydroxyles, et par conséquent, la **charge électrique de surface** σ_0 (C/m²), définie par l'équation suivante (eq. 1.15) est différente :

$$\sigma_0 = \frac{F}{S} ([\equiv\text{Si}-\text{OH}_2^+] + [\equiv\text{Si}-\text{OH}_2^+ \text{A}^-] - [\equiv\text{Si}-\text{O}^-] - [\equiv\text{Si}-\text{O}^- \text{C}^+]) \quad (1.15)$$

où *S* est l'aire des nanoparticules (m².L⁻¹), *F* la constante de Faraday (96500 C.mol⁻¹). Les termes encadrés représentent la concentration en site chargés avec A⁻ celle des anions en solution et C⁺ celle des cations en solution [200]. Au regard de l'éq. (1.15), la charge électrique s'annule pour une valeur de pH appelée **Point de Charge Nulle (PCN)**. Elle est définie par la relation suivante :

$$PCN = \frac{1}{2} (pK_{a1} + pK_{a2}) \quad (1.16)$$

Cette grandeur est différente du **Point IsoElectrique (PIE)** qui correspond au pH pour lequel

1.4. Greffage de polymères à la surface des MSNs : stabilité colloïdale en milieu physiologique

les charges de surface se compensent. D'après la littérature, le point isoélectrique de la silice est aux alentours de $\text{pH} = 2$. Il dépend de la nature de l'électrolyte et du type de silice (amorphe ou quartz) [59, 60].

En solution ionique, la surface des nanoparticules de silice présente une couche d'eau (couche compacte de Stern) dans laquelle les ions H^+ ou OH^- peuvent diffuser afin de protoner ou déprotoner les silanols de surface, créant ainsi le potentiel de surface. Sur la Figure 1.20, nous avons considéré que les silanols étaient tous déprotonés ($\text{pH} > \text{pK}_{a2}$), et que par conséquent, la surface de la particule était chargée négativement (forme SiO^-).

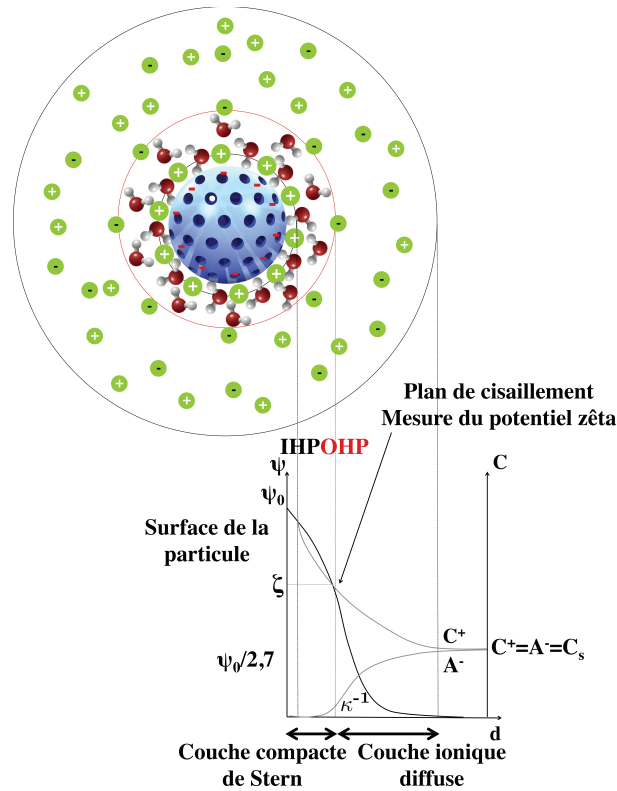


FIGURE 1.20 : Représentation schématisée de l'adsorption de l'eau en surface de la particule (chargée négativement), de la double couche électronique entourant la particule ainsi que de la variation du potentiel électrique et de la concentration ionique en fonction de la distance à l'interface d . ψ_0 représente le potentiel de surface, ψ_d le potentiel électrostatique au niveau du plan externe de Helmholtz (OHP), ζ le potentiel électrocinétique, κ^{-1} la longueur réciproque de Debye, C^+ et A^- les concentrations respectives en cations et en anions de la solution, C_s la concentration totale en électrolyte dans la solution. D'après la référence [207].

Ces charges de surface vont être écrantées par des ions hydratés de charge opposée. On dit qu'ils sont spécifiquement adsorbés en formant des « complexes » avec les sites de surface assimilables à des paires d'ions, mais sans qu'aucun type de liaison ne soit défini. Même s'ils sont difficilement localisables, ces ions sont supposés résider sur un plan moyen appelé plan interne de Helmholtz (IHP) (voir Figure 1.20). Ils constituent la première couche incluse dans la couche compacte de Stern. La deuxième partie de la couche de Stern et une couche de diffusion qui est incluse dans la couche de Stern jusqu'au plan de cisaillement nommé plan externe de Helmholtz (OHP). A partir de l'OHP, la couche ionique diffuse commence jusqu'à ce que le

potentiel s'annule. Généralement, on assimile l'épaisseur de la couche diffuse à une longueur appelée « longueur de Debye-Hückel » ou κ^{-1} . Celle-ci est définie comme la distance à laquelle le potentiel ψ décroît de $\psi_d/2,718$, ψ_d étant le potentiel électrique au niveau de l'OHP. Cette longueur s'exprime par :

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{\epsilon RT}{2000 F^2 I} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1.17)$$

où F est la constante de Faraday (C/mol), R la constante de gaz parfaits (J/mol.K), T la température absolue (K), ϵ la permittivité du milieu (F/m) et I la force ionique définie par $I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2$, avec z_i la charge de l'espèce i et C_i sa concentration. Lorsque la concentration en sels augmente donc lorsque la force ionique du milieu augmente, κ^{-1} diminue ce qui se traduit par une compression de la double couche de Stern et une diminution de l'épaisseur de la couche diffuse.

Le plan externe de Helmholtz (OHP) (voir Figure 1.20) est le plan externe glissant à la limite de la seconde couche. C'est à ce niveau que des ions de la solution vont venir écranter les ions de charge opposée spécifiquement adsorbés et situés au niveau de l'IHP. Lorsque la particule bouge dans le milieu, la structure des deux couches de Stern reste stable. C'est au niveau du plan de cisaillement que les particules interagissent entre elles et c'est à ce niveau que l'on mesure le potentiel zêta. Le potentiel zêta ne peut être mesuré directement, mais doit être déterminé à partir de grandeurs électrocinétiques telles que la mobilité électrophorétique *via* l'utilisation de modèles appropriés (Henry, Hückel, Smoluchowski, ...). Les méthodes de mesure et les modèles utilisés dans cette thèse sont développés en Annexe C.

Selon la théorie DLVO, une suspension aqueuse de silice est instable entre pH = 2 (point de charge nulle) et pH = 8 (lorsqu'une concentration de charges ioniques se développe à la surface des particules pour entraîner une répulsion mutuelle dont la portée est assez importante). Il apparaît cependant que les suspensions de silice sont plus stables que ne le prévoit la théorie DLVO. En effet, lorsque le point de charge nulle est atteint, certaines suspensions de silice résistent à l'aggrégation. Ce comportement est attribué à des forces répulsives dites d'hydratation, qui sont dues aux molécules d'eau dont la structure au voisinage de la silice est modifiée du fait des interactions avec les silanols de surface [208].

Au pH physiologique (pH = 7,4), les suspensions de silice sont donc instables, et ceci est d'autant plus vrai lorsque la force ionique du milieu est élevée ($I = 0,15$ M). Pour les applications biomédicales visées, il est primordial que les nanoparticules mésoporeuses de silice demeurent individualisées dans le temps en milieu biologique (voir paragraphe 1.5.1.3). Il faut donc minimiser les forces de van der Waals. Pour atteindre cet objectif, deux solutions peuvent être mises en œuvre de manière individuelle ou conjointe : induire de la répulsion électrostatique ou induire de la répulsion stérique. Il s'agit de greffer à la surface des nanoparticules des agents capables de donner naissance aux forces qui vont créer les répulsions recherchées.

1.4.3 Stabilisation par voie électrostatique

Afin d'augmenter l'épaisseur de la double couche ionique mais aussi d'élever le potentiel électrique qui lui est associé, divers groupements fonctionnels peuvent être greffés à la surface des nanoparticules de silice. Parmi eux, les organosilanes à fonction amine et ceux à fonction carboxylique sont incontestablement les plus usités [18, 209–211]. Par exemple, Bagwe *et al.* en 2006 ont fonctionnalisé successivement la surface de nanoparticules de silice dense avec le 3-aminopropyltriméthoxysilane (APTMS) puis avec le 3-trihydroxysilylpropylméthylphosphonate (THPMP) [209]. Au pH physiologique, les groupements amines ionisés dont le pK_a vaut 9,0 interagissent avec les groupements phosphonates déprotonés de pK_a 2,0. En conséquence, les particules sont très bien dispersées en solution aqueuse à pH 7,4 mais aucune donnée en Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL) n'est présentée en milieu physiologique. De la même façon, Lu *et al.* ont adapté cette fonctionnalisation aux nanoparticules mésoporeuses de silice [18] mais encore une fois, aucune donnée DDL n'est disponible en milieu physiologique.

1.4.4 Stabilisation par voie stérique

La stabilisation par voie stérique a deux objectifs : d'une part, elle peut permettre par encombrement stérique la stabilisation des nanoparticules en milieu physiologique [212, 213], et d'autre part, elle peut augmenter le temps de circulation dans le sang des nanoparticules en évitant l'adsorption des protéines plasmatiques (opsonines) à leur surface et ainsi retarder leur élimination par le système réticulo-endothélial (RES) [214–217]. Plus de détails seront donnés dans le paragraphe 1.5.1.3.

La stabilisation par voie stérique se fait généralement par greffage en surface des nanoparticules d'un polymère neutre hydrophile comme le PolyÉthylène Glycol (PEG) [218, 219], le dextran [220] ou divers copolymères [221]. Le PEG, dont la formule générale est indiquée sur la Figure 1.21, est le plus couramment utilisé car il est biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique, faiblement immunogène et approuvé pour être injecté à l'homme par la *Food and Drug Administration* (FDA).

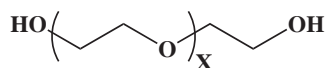


FIGURE 1.21 : Formule du polyéthylène glycol (PEG) simple comportant deux fonctions hydroxyles en bout de chaînes. C'est un polymère composé d'un nombre donné de monomères d'éthylènes glycols.

Les PEGs employés pour l'élaboration de conjugués biologiquement actifs possèdent une masse molaire entre 1 et 20 kDa et peuvent posséder en bout de chaîne des groupements fonctionnels divers et variés [218]. Le greffage de PEG en surface des nanoparticules favorise aussi l'accumulation passive dans les tumeurs grâce à l'effet EPR (voir paragraphe 1.5.1.3), permettant une meilleure efficacité thérapeutique de substances médicamenteuses dans les nanoparticules et augmente la demi-vie plasmatique des nanoparticules [222].

Au regard de la littérature, l'influence du greffage de PEG (taux, longueur de chaîne, taille des particules) sur la stabilité colloïdale des MSNs en milieu physiologique a très peu été étudiée [16]. Dans la majorité des cas, les études ne montrent que la taille DDL sur quelques minutes, ce qui n'est absolument pas convaincant. Par contre, l'influence de la présence de PEG en surface des MSNs sur leur biodégradabilité [223, 224] et leur élimination par le système réticuloendothélial [225] a été étudiée. Il apparaît que le greffage de PEG améliore la bio-stabilité structurale des MSNs, mais aussi évite leur élimination si un PEG de masse molaire supérieure à 10 kD est utilisé [223, 224].

1.4.5 Stabilisation par voie électro-stérique

Une autre voie consiste à utiliser des polymères réticulés et chargés comme la Polyéthylèneimine (PEI). Le greffage de PEI en surface des MSNs a été étudié ces dernières années car la PEI peut jouer le rôle de dispersant cationique et d'agent de transfection [226–229]. Dernièrement, Xia *et al.* ont démontré que l'internalisation des MSNs était facilitée par le greffage de PEI [230]. Clemens *et al.* ont aussi suggéré que le greffage de PEI en surface des MSNs permettait le relargage préférentiel d'anticancéreux hydrophobes ou de molécules modèles [231]. La PEI peut être aussi utilisée afin d'augmenter la dispersion des nanovecteurs. En effet, elle possède de nombreux sites amines (primaires, secondaires et tertiaires) susceptibles de se protoner, conduisant ainsi à de nombreuses charges positives au pH physiologique.

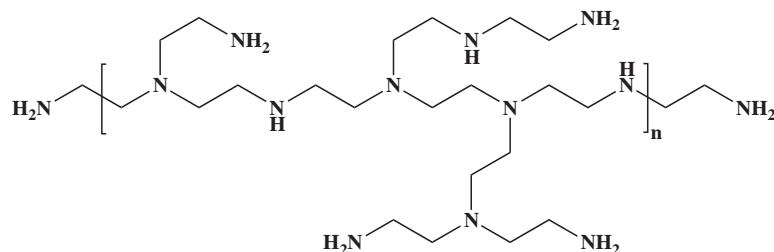


FIGURE 1.22 : Formule de la polyéthylèneimine (PEI) branchée. Ce polymère de haute densité de charges comporte des amines primaires, secondaires et tertiaires.

1.5 Vectorisation du cisplatine

L'utilisation de nano-objets pour la **vectorisation** de principes actifs est une méthode alternative aux traitements de chimiothérapie car elle permet de réduire les effets secondaires en ciblant plus spécifiquement les cellules cancéreuses et permet d'éviter dans certains cas, les phénomènes de résistance développés par les cellules tumorales vis-à-vis des agents anticancéreux. Par rapport aux thérapies ciblées (anticorps monoclonaux), la vectorisation permet d'augmenter considérablement l'efficacité, la spécificité et la sécurité biologique des principes actifs, en favorisant leur accumulation au niveau des tissus tumoraux.

Le concept même de la vectorisation des principes actifs est né dans un laboratoire de l'Université d'Harvard, il y a maintenant une cinquantaine d'années. Judah Folkman, en provoquant

1.5. Vectorisation du cisplatine

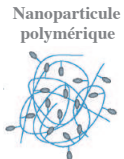
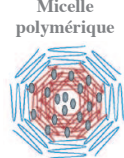

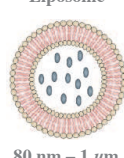

l'endormissement d'un lapin après avoir fait circuler son sang à travers un tube préalablement exposé à un anesthésiant, constata que le tube pouvait jouer le rôle de « réservoir » qui peut permettre de libérer progressivement la molécule. A partir de cette idée, différents vecteurs macroscopiques ont été développés. On peut citer le Vaginal Ring[®], contenant un contraceptif déposé dans le col de l'utérus, ou l'Ocusert[®], contenant la pilocarpine contre le glaucome déposé sur la rétine [232].

1.5.1 Généralités sur la vectorisation

1.5.1.1 Les différents systèmes de vectorisation existants

Depuis la fin des années quatre-vingt-dix, plusieurs vecteurs ont été développés afin d'encapsuler des principes actifs. Ces vecteurs peuvent être des nanoparticules polymériques, des micelles polymériques, des dendrimères, des liposomes ou des nanotubes de carbone (Tableau 1.4).

TABLEAU 1.4 : Vecteurs existants utilisés pour la délivrance médicamenteuse.

Système	Structure	Caractéristiques	Exemples	Références
 Nanoparticule polymérique 10 nm – 1 µm	Les anticancéreux sont conjugués à la chaîne latérale linéaire par une liaison clivable	Hydrophile ou hydrophobe Modification de surface (PEG) Biodégradable non-toxique	Albumine-Taxol PGA-Taxol HPDMA-DOX	[233] [234] [235]
 Micelle polymérique 100 – 300 nm	Copolymères séquencés amphiphiles formant un coeur hydrophobe une surface hydrophile	Soluble dans l'eau Idéal pour les anticancéreux insolubles dans l'eau Biocompatible Biodégradable Fonctionnalisation possible	PEG-PGA-CDDP PEG-pluronic-DOX	[236] [237]
 Dendrimère < 15 nm	Construction polymérique synthétique fortement branchée	Biodistribution et pK ajustable Homogénéité structurale et chimique Contrôle de la dégradation Fonctionnalisation facile Densité de ligand importante	PAMAM-platinate	[238]
 Liposome 80 nm – 1 µm	Vésicule sphérique fermée entourée d'une ou plusieurs membranes phospholipidiques	Amphiphile Modification facile Biocompatible	Lipoplatine TM Doxil [®] Abraxane [®] Ambisome [®]	[239] [240] [241] [242]
 Nanotube de carbone 100 nm – qqes µm	Feuille de graphène enroulée sur elle-même	Soluble dans l'eau Biocompatible après modification Multifonctionnel	CNT-MTX	[243]

Abréviations : PGA, poly-L-glutamique ; HPDMA, N-(2-hydroxypropyle)-methacrylamide ; DOX, doxorubicine ; CNT, nanotube de carbone ; MTX, méthotrexate ; PAMAM, poly(amidoamine). D'après [4, 244, 245].

La taille de ces vecteurs est extrêmement variable et est comprise entre quelques nanomètres et quelques micromètres. Certains sont déjà commercialisés, d'autres sont en phase d'essais précliniques ou cliniques, ou encore en phase d'expérimentation dans les laboratoires. Parmi ceux déjà utilisés en clinique, on peut citer les liposomes encapsulant de l'amphotéricine B (Ambisome®), de la doxorubicine (Doxil®) ou du paclitaxel (Abraxane®).

1.5.1.2 Les principes du ciblage tumoral

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme qui échappent aux mécanismes normaux de la différenciation et de la régulation de leur prolifération. Contrairement aux vaisseaux normaux, les réseaux vasculaires associés aux tumeurs sont structurellement et fonctionnellement anormaux. Ils présentent des différences architecturales, histologiques et hémodynamiques [246]. Ces anomalies anatomiques et physiopathologiques sont caractérisées par une perméabilité vasculaire accrue et une maigre clairance lymphatique pouvant engendrer une augmentation de la rétention des composés plasmatiques, de macromolécules ou de nanoparticules au sein des tissus tumoraux [247, 248]. L'ensemble de ces propriétés vasculaires permettant l'extravasation et l'accumulation dans les tumeurs est appelé l'effet *Enhanced Permeability and Retention* (EPR). Il est mis à profit pour permettre une accumulation sélective des principes actifs *via* des nano-objets au sein des tumeurs solides. Cet effet est représenté sur la Figure 1.23(b) et est appelé **ciblage passif**.

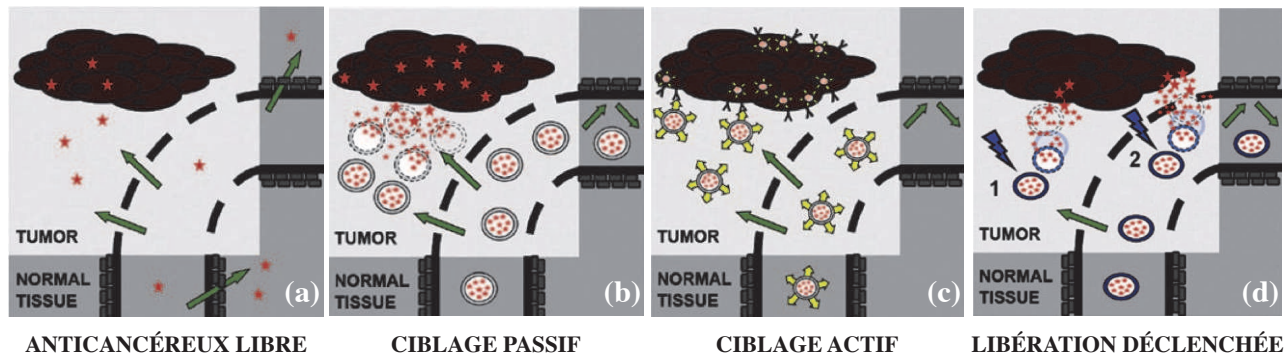


FIGURE 1.23 : *Stratégies de ciblage tumoral les plus usuelles et les plus adaptées aux applications cliniques. D'après [3].*

Alors que les jonctions endothéliales sont espacées de 5 à 10 nm dans le cas des tissus sains (les anticancéreux passent cette barrière) [249], cet espace peut varier entre 100 nm et 1 μm dans le cas des tissus tumoraux [250–252]. Cette piste permet l'extravasation des nano-objets contenant la molécule d'intérêt pharmaceutique. En 1986, Mastumura *et al.* ont démontré qu'il est possible, en un à deux jours, d'obtenir des concentrations en principe actif, 10 à 50 fois supérieures à celles obtenues dans les tissus sains [252]. L'effet EPR dépend principalement du degré de vascularisation, de la taille et du stade d'évolution de la tumeur [248]. Une meilleure extravasation est observée pour les tumeurs de petite taille, probablement à cause d'une densité de vaisseaux supérieure par rapport aux tumeurs de grande taille présentant une région avasculaire [253].

En plus du **ciblage passif** des tissus tumoraux, l'interaction des vecteurs avec les cellules tumorales peut être améliorée par greffage d'un motif de ciblage sur le vecteur, qui permettra la reconnaissance des récepteurs membranaires au niveau du tissu cible (Figure 1.23(c)). On parle alors de **ciblage actif**. Les récepteurs membranaires sont spécifiquement sur-exprimés dans le cas des cellules tumorales car ils sont associés à la croissance très active des tumeurs. Parmi ceux-ci, on trouve le récepteur aux facteurs de croissance de type 2 (HER-2), le récepteur à la transferrine ou encore le récepteur au peptide vasoactif intestinal (VIP-R) [254, 255]. En adoptant cette stratégie, l'activité anti-tumorale est améliorée par rapport au ciblage passif [256–258]. Cette différence d'activité des nano-objets n'est pas due à une plus grande accumulation des nanoparticules au niveau des tissus tumoraux mais à une augmentation de l'internalisation cellulaire à cause de l'endocytose des récepteurs sur-exprimés par les puits de clathrine, comme les récepteurs à la transferrine ou au folate [256–258]. Par exemple, Oyewumi *et al.* montrent que des nanoparticules de Gadolinium de 100 nm de diamètre fonctionnalisées par l'acide folique, présentaient une accumulation tumorale similaire à celle des nanoparticules non fonctionnalisées mais une internalisation 20 fois supérieure [258].

Les vecteurs sans molécule de ciblage semblent dans certains cas les plus avantageux. En effet, dans le cas des tumeurs solides, la diffusion des vecteurs est limitée par l'exiguïté des jonctions cellulaires, ce qui implique que les vecteurs restent en surface de la tumeur. Pour une meilleure diffusion dans tout le volume tumoral, il est préférable que la libération de l'anticancéreux se fasse autour de la tumeur. Si les vecteurs sont trop rapidement internalisés (cas du ciblage actif), seule la surface de la tumeur est ciblée. Dans le cas des tumeurs solides, il est donc plus avantageux d'utiliser le ciblage passif.

Pour finir, les nano-structures sensibles aux *stimuli* peuvent être injectées par voie systémique puis activées au niveau de la tumeur par les ultra-sons [259], un laser [260] ou un champ magnétique [261] (Figure 1.23(d)). On parle alors de **libération déclenchée**. La diminution intrinsèque du pH au niveau du milieu extracellulaire des tissus tumoraux et dans le cytoplasme cellulaire peut être aussi mise à profit afin de mettre au point des vecteurs dont la libération de l'anticancéreux dépend du pH. Ceci permet d'éviter une libération prématurée de l'anticancéreux [262–265].

1.5.1.3 L'influence des propriétés physico-chimiques des nano-objets sur leur devenir en milieu biologique

Les nano-objets doivent présenter des caractéristiques physico-chimiques spécifiques afin qu'ils puissent s'accumuler de manière efficace au niveau des tissus tumoraux en déjouant les mécanismes de défense de l'organisme, être internalisés et libérer ensuite la molécule active. Ces caractéristiques sont la **taille**, les **propriétés de surface** et la **forme** [266].

Tout d'abord, la **taille** des nano-objets doit être contrôlée de manière à ce qu'ils puissent pénétrer dans les pores de l'endothélium des vaisseaux tumoraux, qui peuvent être compris

entre 100 nm et 1 μm [250–252]. D'autre part, ces nano-objets doivent posséder une taille supérieure à celle des jonctions endothéliales des tissus sains, qui est comprise entre 5 et 10 nm, de manière à ne pas y pénétrer [249]. Afin d'éviter d'être filtrés par les reins et ainsi échapper au Système Réticulo-Endothélial (SRE) appelé aussi Système Phagocytaire Mononucléé (SPM), les nano-objets doivent avoir une taille supérieure à 60 nm [267, 268]. En effet, les reins possèdent un endothélium fenêtré dont les jonctions sont de l'ordre de 40 à 60 nm. Les nano-objets doivent donc avoir une taille supérieure à 60 nm pour ressortir des reins. Enfin, les nano-objets doivent avoir une taille inférieure à celle des capillaires sinusoides ou fenêtrés présents respectivement dans la rate ou dans le foie (cellules de Kupffer), *i.e.* entre 150 et 200 nm, afin de ne pas s'y accumuler [269]. Ainsi, la taille optimale des nano-objets pour une accumulation passive efficace se situe entre **60 et 150 nm**.

L'**internalisation** cellulaire des nano-objets dépend également de leur **taille**. La taille des nano-objets doit en effet, être de l'ordre de la centaine de nanomètres pour permettre l'internalisation par les principales voies d'endocytose (macropinocytose, clathrine, pinocytose...). De nombreuses études confirment que ce facteur est important pour l'efficacité de l'endocytose [266]. Des particules de 1 μm pénètrent peu dans les cellules, et ce, probablement par un mécanisme de phagocytose [82]. L'efficacité de l'endocytose dépend de la taille mais aussi de la nature intrinsèque du nano-objet et, *a priori*, aucune règle générale ne peut être avancée. En effet, parmi des nanoparticules d'or d'un diamètre compris entre 10 et 100 nm, les nanoparticules de 50 nm sont les mieux internalisées [270]. *A contrario*, des nanoparticules de polystyrène de 100 nm sont endocytées en plus grande quantité que celles de 50 nm [271].

Les **propriétés de surface** sont aussi déterminantes pour le devenir des nano-objets dans le flux sanguin. En effet, les nano-objets chargés positivement, négativement ou hydrophobes sont rapidement captés par le SRE (*via* des interactions non spécifiques avec les opsonines) puis stockés dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques, en vue d'une élimination ultérieure [244]. Par ailleurs, comme nous l'évoquions précédemment, une charge de surface élevée ne garantit pas la stabilité colloïdale des nano-objets en milieu physiologique, condition *sine qua non* à l'accumulation des vecteurs dans les tumeurs par effet EPR. Pour ces deux raisons, différents polymères sont couramment adsorbés ou greffés de manière covalente en surface des nano-objets. Parmi ces polymères, on peut citer le PolyÉthylèneGlycol (PEG), divers polysaccharides comme les dextrans, le chitosan, les héparines ou encore divers copolymères comme les copolymères pluronic [221, 272]. Après le greffage de ces polymères, les opsonines s'associent beaucoup plus difficilement aux nano-objets, ce qui permet d'éviter l'élimination des vecteurs par les macrophages et contribue ainsi à augmenter leur demi-vie plasmatique. Par exemple, Hong *et al.* ont montré que des liposomes PEGylés (6% mol.) et chargés en doxorubicine ont une demi-vie plasmatique plus importante, ce qui permet d'augmenter de 50% la quantité d'anticancéreux accumulée dans les tissus tumoraux par rapport aux liposomes non PEGylés [273]. En revanche, certaines études tendent à montrer que la PEGylation limite l'internalisation des nano-objets,

1.5. Vectorisation du cisplatine

induisant une efficacité modérée surtout lorsque les tumeurs développent des phénomènes de résistance vis-à-vis de l'anticancéreux [274, 275].

Enfin, la **charge de surface** des nano-objets influence leur **internalisation**. Par exemple, Slowing *et al.* ont montré que des nanoparticules de silice chargées positivement sont plus facilement endocytées que celles qui présentent des charges négatives, et ce, probablement à cause de l'interaction avec la membrane cellulaire chargée négativement [276].

Pour finir, la **forme** des nanoparticules semble être un facteur clef pour l'internalisation des nano-objets. En effet, Chithrani *et al.* montrent que des nanoparticules d'or de 14 nm sont plus endocytées que les mêmes nanoparticules ovoïdales de 14 nm de largeur et 74 nm de longueur [277]. De manière contradictoire, Trewyn *et al.* montrent que plus de cellules internalisent des nanoparticules mésoporeuses allongées que des MSNs sphériques [278]. Les MSNs sphériques sont en revanche endocytées plus rapidement que les MSNs allongées [278].

1.5.1.4 Les différentes générations de vecteurs

Les considérations physico-chimiques des nano-objets citées précédemment, qui prennent en compte les obstacles qui doivent être surmontés *in vivo*, conduisent à définir quatre générations de vecteurs, comme le montre la Figure 1.24.

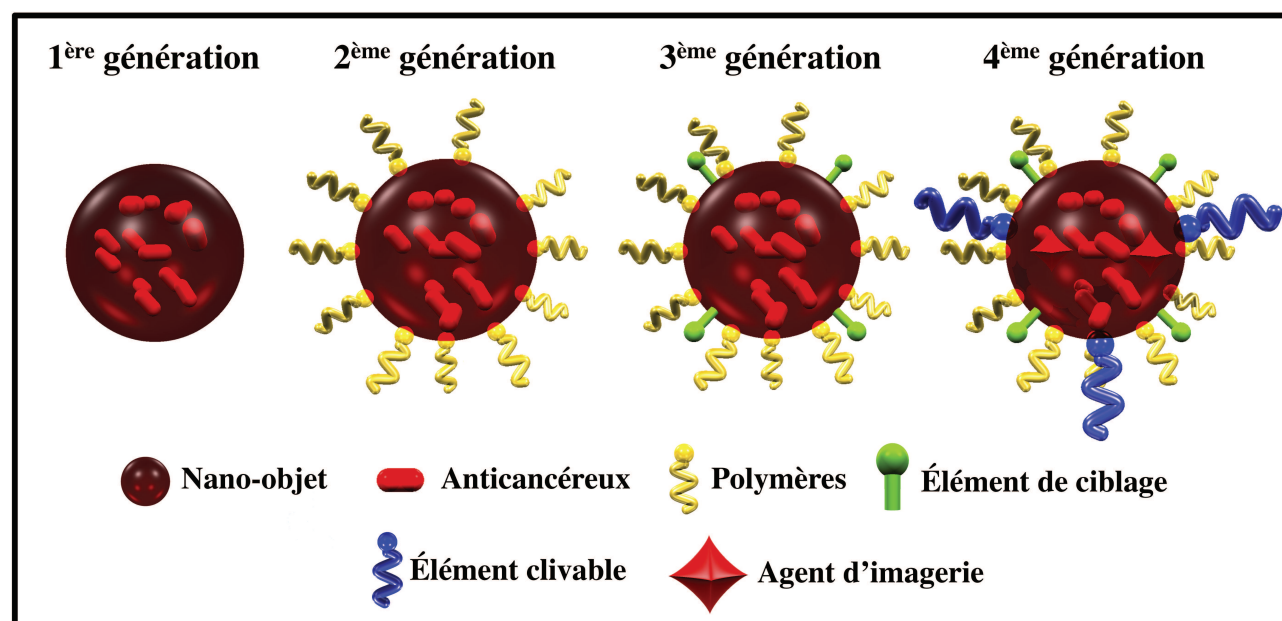


FIGURE 1.24 : Représentation schématique des quatre générations de vecteurs.

La **première génération** de vecteurs correspond à l'encapsulation de principes actifs au sein de nano-objets mais qui ne présentent aucune propriété de furtivité et de ciblage. Cette première génération permet de ralentir l'élimination des principes actifs par la voie rénale mais son utilisation reste limitée car ces nano-objets s'accumulent rapidement dans le foie et la rate après leur prise en charge par les macrophages. Afin de limiter cette capture, la surface des nano-objets est modifiée par des agents de furtivité, limitant la fixation des opsonines et leur élimination par les cellules du système immunitaire. Les nano-objets ainsi obtenus

sont dits de **deuxième génération** et peuvent s'accumuler dans les tissus tumoraux par effet EPR. L'étape suivante est l'introduction de marqueurs de ciblage, comme des anticorps, des peptides, des oligonucléotides, des saccharides ou des folates et permet d'augmenter l'efficacité anti-tumorale des nano-objets chargés par une augmentation de leur internalisation cellulaire. Ces vecteurs sont dits de **troisième génération**. La dernière génération de vecteurs correspond à des vecteurs dits « intelligents », qui peuvent améliorer le ciblage et l'efficacité anti-tumorale en limitant la libération prématurée de l'anticancéreux dans le flux sanguin. Ce sont les vecteurs de **quatrième génération**. Ils exploitent deux propriétés caractéristiques des tumeurs : le pH et la sur-expression des protéinases extracellulaires. En effet, le pH extracellulaire des tumeurs est souvent plus acide ($\text{pH} = 6,5$) que le pH du sang ($\text{pH} = 7,4$) [263] et la production d'enzymes nécessaires à la croissance de la tumeur est souvent très élevée [279]. Par introduction de fonctions sensibles au pH (hydrazone, acétal, orthoester... [263, 264]) ou clivables par des enzymes du milieu extracellulaire [124], la libération a lieu de manière préférentielle au niveau des tissus tumoraux. De surcroît, l'addition d'agents d'imagerie comme des sondes fluorescentes, des agents de contraste ou des éléments radioactifs, permet de suivre en temps réel les nano-objets dans l'organisme et ouvre la voie à la **théranostique** [280].

Tous les nano-objets que nous avons présentés précédemment sont principalement organiques. Cependant, ces systèmes souffrent d'inconvénients majeurs comme d'une stabilité thermique et chimique insuffisante, ou encore d'une dégradation trop rapide dans l'organisme [11]. C'est pourquoi, de plus en plus d'études portent sur l'utilisation de nanoparticules inorganiques pour la thérapie, le diagnostic ou l'imagerie. Par rapport à leurs analogues organiques, elles possèdent une stabilité mécanique, thermique et chimique supérieure, une biocompatibilité plus élevée ainsi qu'une plus grande résistance aux attaques biochimiques [11, 281, 282]. Il s'agit de nanoparticules d'or [270], d'oxyde de fer [283] ou de silice [14].

1.5.2 Vers un nouveau système de vectorisation du cisplatine

La silice est un polymère inorganique de formule générale SiO_2 ou $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, qui consiste en un assemblage de tétraèdres SiO_4 reliés entre eux par leur sommet. La silice existe abondamment à l'état naturel sous forme cristalline (quartz, tridymite, cristobalite) mais peut être aussi synthétique, et est dans ce cas, majoritairement amorphe [11]. Contrairement à la silice cristalline à l'origine de la silicose, la silice amorphe est non toxique [11]. De ce fait, elle est utilisée dans de nombreux domaines industriels (principalement sous forme colloïdale) tels que la cosmétique, l'agroalimentaire ou la pharmacologie [284]. Depuis quelques années, les nanoparticules de silice et plus spécifiquement les **nanoparticules mésoporeuses de silice**, ont fait l'objet de nombreuses études pour des applications en imagerie biomédicale (encapsulation de fluorophores, IRM) et en thérapie (libération contrôlée, photothérapie dynamique) [12, 170, 191, 227, 285, 286].

Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les MSNs sont **biocompatibles** jusqu'à des concentrations parfaitement adaptées à des applications pharmacologiques, *i.e.* 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

1.5. Vectorisation du cisplatine

(*in vitro*) et 200 mg/kg (*in vivo*) [12]. Ces valeurs sont à prendre avec précaution car des facteurs tels que la taille, la charge, et la structure des particules peuvent expliquer une différence de toxicité. De plus, les résultats des études de toxicité *in vitro* dépendent du type cellulaire [287]. Néanmoins, de nombreuses études certifient que les MSNs peuvent être considérées comme biocompatibles [11, 288–294].

Les MSNs possèdent des propriétés structurales et texturales uniques, comme une surface spécifique élevée ($> 700 \text{ m}^2/\text{g}$), un volume poreux important ($> 1 \text{ cm}^3/\text{g}$) et une taille de pore ajustable (2-10 nm). Ces propriétés permettent un taux de chargement important en anticancéreux, un contrôle de la cinétique de libération du médicament et permet de le protéger. De plus, il est possible de fonctionnaliser aussi bien la surface externe que l'intérieur des canaux, grâce à la présence de groupements silanols dont la densité est d'environ $3 \text{ OH}^-/\text{nm}^2$) [26, 295–298]. Une représentation schématique d'une nanoparticule mésoporeuse de silice est indiquée sur la Figure 1.25.

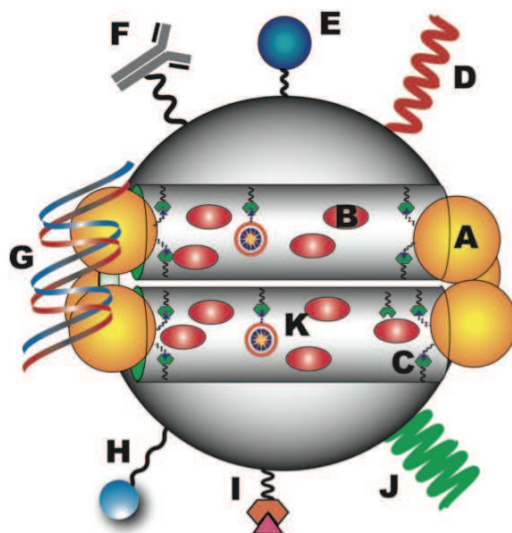


FIGURE 1.25 : Représentation schématique d'une nanoparticule mésoporeuse de silice considérée comme une plateforme multifonctionnelle pour la vectorisation médicamenteuse. **A)** contrôle du relargage par un « gardien » (CdS , Fe_3O_4), **B)** anticancéreux, **C)** groupement organique clivable (pH , enzyme...), **D)** polymères, **E)** agent d'imagerie (fluorophore, nanoparticules magnétiques, quantum dots), **F)** agent de ciblage, **G)** complexation avec l'ADN, **H)** agent de ciblage additionnel permettant une internalisation (peptides), **I)** agent de diagnostic, **J)** polymères sensibles à un stimulus (pH , température), **K)** groupements fonctionnels modifiant le métabolisme cellulaire. D'après [12].

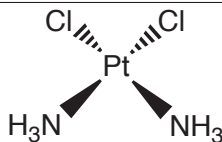
De la même façon que les nano-objets organiques, l'internalisation des MSNs dépend de leur taille, de leur forme et de leur charge de surface [276, 289, 299]. De nombreux anticancéreux ont déjà été encapsulés à l'intérieur des canaux des MSNs comme le paclitaxel [300], la camptothécine [18], la doxorubicine [301], le méthotrexate [302] ou encore la colchicine [303]. Par contre, très peu d'études portent sur l'encapsulation du cisplatine dans les nanoparticules mésoporeuses de silice.

1.5.3 Généralités sur le cisplatine

1.5.3.1 La découverte du cisplatine

Bien que le cis-diamminedichloroplatine(II) ou cisplatine (Tableau 1.5) ait été synthétisé pour la première fois en 1847 sous le nom de « sel de Peyrone », son action antitumorale n'a été découverte que fortuitement dans les années 1960 par Barnett Rosenberg [304, 305]. Ce dernier observa l'inhibition de la division cellulaire des bactéries *Escherichia coli* au contact de deux électrodes de platine soumise à un courant électrique et plongées dans un milieu de culture contenant du chlorure d'ammonium. Quelques années après, Muggia *et al.* démontrèrent que ce phénomène était dû à la présence dans le milieu de culture des produits d'électrolyse : deux actifs, le cisplatine et le cis-diamminetétrachloroplatine(IV) et un complexe moins actif, le transplatine [306]. Après avoir testé le cisplatine sur différentes lignées de bactéries, Rosenberg *et al.* réalisèrent des injections intra-péritonéales (8 mg/Kg) chez des souris porteuses de tumeurs (sarcomes implantés artificiellement) [307] puis chez l'homme dès 1971. Le cisplatine s'avéra extrêmement efficace et reçut l'agrément de l'agence américaine *Food and Drug Administration* (FDA) en 1978 [308].

TABEAU 1.5 : Caractéristiques physico-chimiques du cisplatine.

Nom	Cisplatine <i>cis</i> -diamminedichloroplatine(II)
Formule brute	$\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$
Représentation de Cram	
Masse molaire (g/mol)	300,04

Actuellement, le cisplatine est l'un des trois agents anticancéreux les plus utilisés dans le monde pour traiter les tumeurs du testicule, de l'ovaire, du col de l'utérus, de l'endomètre, de la sphère ORL, de l'œsophage, de la vessie, les cancers épidermoïdes, bronchiques, et de l'estomac. Il est habituellement prescrit en poly-chimiothérapie, en association avec d'autres médicaments comme le 5-fluororacile [309] et l'arabinofurannosylecytosine [310].

1.5.3.2 Pharmacologie cellulaire et mécanisme d'action du cisplatine

Une fois administré dans la circulation générale par voie intraveineuse, le cisplatine diffuse dans les tissus avant d'être éliminé essentiellement par les reins. Dans le plasma riche en chlore (concentration égale à environ 100 mM), le cisplatine reste stable sous sa forme bichlorée [311]. Une fois passé dans l'espace intracellulaire où la concentration en chlore est beaucoup plus faible (entre 3 et 20 mM), le cisplatine subit en milieu aqueux des transformations par des réactions d'hydrolyse successives et des réactions acido-basiques indiquées (Figure 1.26) [312, 313]. Les produits des réactions d'hydrolyse et des équilibres acido-basiques $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$,

1.5. Vectorisation du cisplatine

$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ et $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})(\text{OH}_2)]^+$ sont des espèces chimiques beaucoup plus réactives que la forme chlorée car elles sont chargées positivement. Ces espèces électrophiles vont pouvoir interagir avec une grande diversité de composés au sein de la cellule comme les phospholipides, les protéines, l'ADN ou encore l'ARN [311]. La forme active semble donc être soit la forme monoqua ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$), soit la forme diaqua ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$) [314]. Dans le cas d'une interaction avec l'ADN, les sites potentiels de fixation des dérivés du platine sont préférentiellement les atomes N-7 des bases purines, *i.e.* guanine et adénine (Figure 1.27) [315].

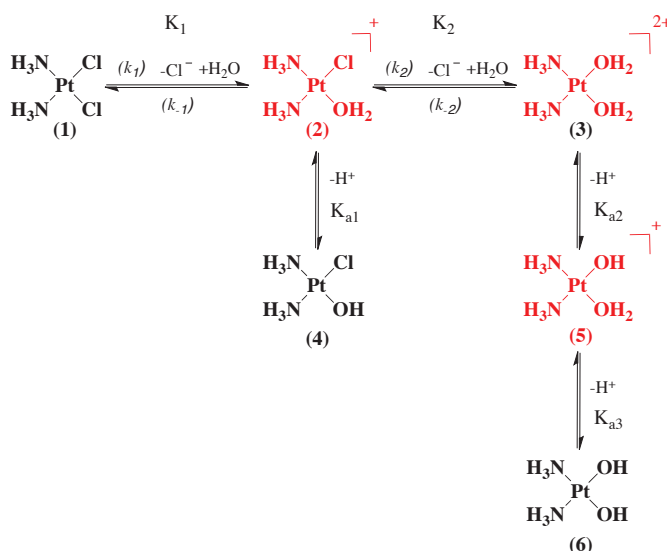


FIGURE 1.26 : Réactions successives d'hydrolyse et de déprotonation du CDDP en milieu aqueux ($pK_{a1} = 6,41$; $pK_{a2} = 5,37$; $pK_{a3} = 7,21$) [313]. Les espèces chargées positivement (rouge) sont très réactives.

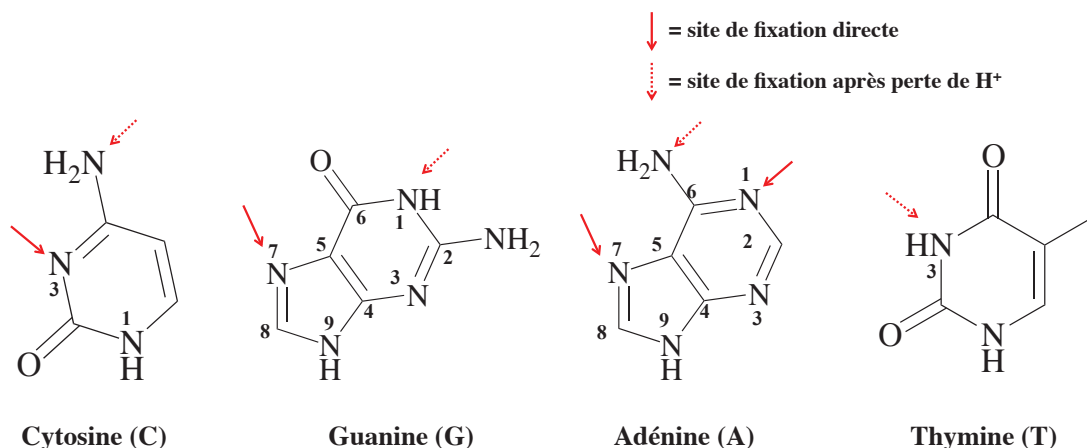


FIGURE 1.27 : Sites de fixation préférentiels du cisplatine sur les bases nucléiques de l'ADN [316].

Au niveau de la double hélice de l'ADN, différents types d'adduits sont susceptibles de se former. Si les deux bases appartiennent au même brin d'ADN, les adduits sont dits « intrabrins » (liaison 1,2-intrabrin). Lorsqu'elles sont situées sur l'un et l'autre brin, les adduits sont dits « interbrins » (Figure 1.28). Les adduits intrabrins entre deux purines adjacentes sont les plus fréquents et représentent 47-50% pour les bases guanines (dGpG) et 23-28% pour l'adénine (dApG) [317–319]. Les liens entre le platine et deux guanines séparées par une autre base (liaison

1,3-intrabrin) représentent 8 à 10% des liaisons avec le Pt(II) tandis que les liens interbrins entre le Pt(II) et deux guanines seulement 2-3% [320].

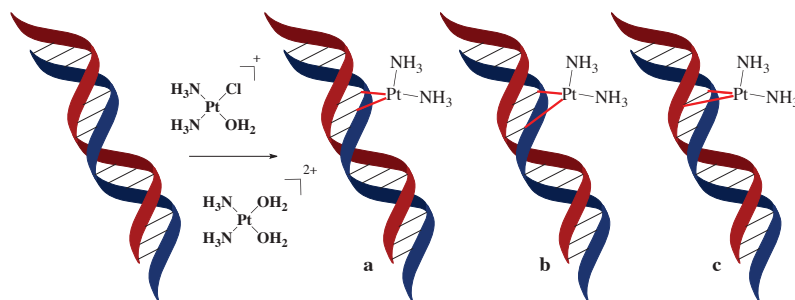


FIGURE 1.28 : Différents types d'adduits possibles après exposition de l'ADN au cisplatine. L'adduit 1,2-intrabrin (a) entre deux purines voisines est le plus fréquent. Les adduits 1,3-intrabrin (b) et interbrin (c) sont plus rares. Il existe également des pontages monofonctionnel ou bifonctionnel sur protéine non représentés ici.

Les adduits formés génèrent des modifications de la structure en trois dimensions de la molécule d'ADN. A cause de ces adduits, les mécanismes de réplication et de transcription de l'ADN, ainsi que d'autres fonctions nucléaires sont inhibés, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et à la mort cellulaire par apoptose [321]. Ainsi, la prolifération des cellules cancéreuses, et par conséquent la croissance tumorale, se retrouvent bloquées. Ce processus conduisant à la mort cellulaire est assez efficace puisque seul 1% du cisplatine intracellulaire se fixe à l'ADN, le reste se liant aux protéines cytoplasmiques et aux molécules comportant des fonctions soufrées comme le glutathion [322].

1.5.4 Les problèmes liés au cisplatine

Bien que le cisplatine soit l'un des anticancéreux les plus utilisés en clinique, il est confronté à deux freins majeurs : d'une part, des **effets secondaires** parfois très graves sont observés chez certains patients et, d'autre part, les tumeurs développent des **résistances** vis-à-vis de cette substance active.

Les observations cliniques montrent que les patients traités par le cisplatine présentent des **effets secondaires** importants tels que des nausées et vomissements, des irritations de la bouche, la diarrhée, des modifications de la peau, une chute des cheveux... Tous ces effets secondaires sont provoqués par des toxicités hématologiques, rénales et neurologiques. La toxicité hématologique du cisplatine provient du fait que 60 à 97% de cette substance active interagit avec les protéines plasmatiques, provoquant ainsi des complications vasculaires tels que des accidents vasculo-cérébraux, des infarctus du myocarde et des thrombus capillaires et artériels [323]. La toxicité rénale se traduit par la présence d'une insuffisance rénale qui provient du fait qu'après injection par voie intraveineuse, le cisplatine est filtré par les reins. Cette toxicité est souvent ralentie en provoquant une diurèse forcée avec 3L de NaCl à 0,9% pendant 24 heures et du furosémide [323]. La toxicité neurologique provoque généralement des tremblements, des paresthésies, des vertiges et des acouphènes et se manifeste après une dose de traitement cumulée

1.5. Vectorisation du cisplatine

supérieure à 600 mg/m² [324]. Les effets de ces toxicités sont très inconstants (à prendre au cas par cas) et impliquent une surveillance permanente du patient par ionogramme, hémogramme ainsi qu'une mesure de la fonction rénale.

L'un des problèmes majeurs de l'utilisation du cisplatine comme agent anticancéreux est l'apparition des **phénomènes de résistance** de certaines lignées vis-à-vis de ce médicament. Cette résistance est intrinsèque (exemple du cancer du côlon) ou peut être acquise suite à des administrations répétées de cisplatine au cours du traitement (exemple du cancer des ovaires). De nombreux phénomènes peuvent être à l'origine de l'apparition de ces résistances vis-à-vis du cisplatine comme les changements de l'accumulation intracellulaire de l'anticancéreux (influx et efflux), l'augmentation de la production intracellulaire de molécules comportant des thiols (glutathion) [325, 326] et l'augmentation de la capacité de la cellule à réparer les adduits cisplatine-ADN (systèmes enzymatique NER¹¹ et NMR¹²) [7, 327, 328].

Dans le but d'augmenter l'activité, c'est-à-dire l'efficacité cytotoxique d'une part, et le spectre d'action d'autre part (augmentation du nombre de tumeurs sensibles), de diminuer la toxicité et d'empêcher l'émergence de résistances par les cellules, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre :

- la **poly-chimiothérapie**, qui associe le traitement au cisplatine avec la radiothérapie ou avec de nombreux autres agents anticancéreux [329] ;
- la **synthèse des différents analogues**, comme le carboplatine [330], l'oxaliplatine [331] ou le nedaplatine [332] (Figure 1.29) actuellement utilisés en chimiothérapie pour certains cancers où le cisplatine est inefficace. D'autres analogues comportant deux, trois ou quatre centres de platine de configuration cis et/ou trans ont aussi vu le jour [333] ;

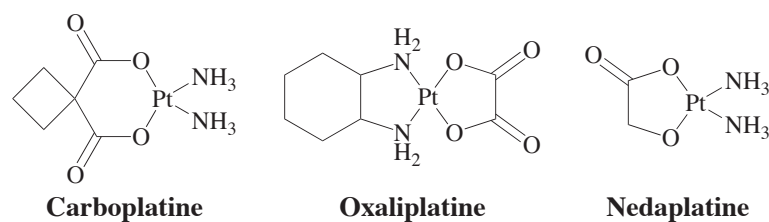


FIGURE 1.29 : Les sels de platine(II) couramment utilisés en chimiothérapie anticancéreuse.

- la **vectorisation**, qui permet de protéger le composé actif, de prolonger son temps de circulation dans le sang et de diminuer son accumulation dans les tissus sains, tels que les reins, et d'augmenter celle dans les tissus tumoraux.

1.5.5 Les systèmes organiques de vectorisation du cisplatine

Parmi les nano-systèmes organiques présentés précédemment, quatre d'entre eux ont été utilisés pour la vectorisation du cisplatine. Il s'agit des liposomes, des micelles polymériques, des nanoparticules de copolymère et des nanocapsules. L'encapsulation du cisplatine dans ces

11. Nucleoside Excision Repair

12. MisMatch Repair

nano-systèmes ayant fait l'objet de nombreuses études, nous nous contenterons de présenter pour chaque type de nanovecteurs les articles les plus marquants.

1.5.5.1 Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules artificielles formées par auto-association d'une ou plusieurs bi-membranes phospholipidiques. Ces structures colloïdales renferment une phase interne aqueuse, ce qui leur permet de véhiculer des anticancéreux hydrophiles. Des anticancéreux lipophiles peuvent aussi être transportés dans leur membrane.

L'une des formulations liposomales la plus étudiée pour la vectorisation du cisplatine est le lipoplatineTM (Figure 1.30). Cette nanoparticule d'environ 110 nm de diamètre, est composée de lipides tels que la phosphatidyl-choline, le cholestérol, le dipalmitate phosphatidylglycérol (DPPG) et le méthoxy-PEG phosphatidyléthanolamine (mPEG₂₀₀₀-DSPE). Le lipoplatine est composé de 8,9% cisplatine et 91,1% lipides (m/m) et possède une demi-vie plasmatique longue estimée à 120 heures [239]. Une concentration en platine deux cents fois supérieure au cisplatine libre est retrouvée dans les tumeurs solides des patients traités par le lipoplatine. De surcroît, les évaluations en phase clinique I, II et III ont montré que cette formulation a une activité similaire au cisplatine pour les cancers du pancréas, du poumon, du cou et de la tête, et permet de réduire considérablement sa toxicité, notamment sa néphrotoxicité [8, 9].

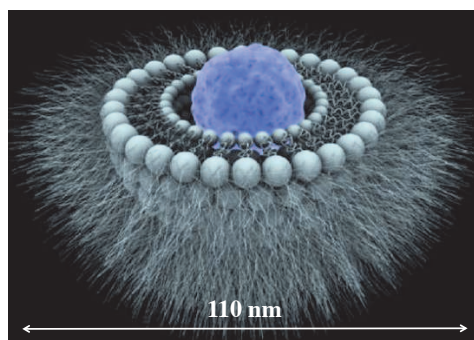


FIGURE 1.30 : Représentation schématique d'une nanoparticule PEGylée de LipoplatinTM. Le cisplatine est représenté par la sphère bleue. D'après [9].

Néanmoins, ce système présente l'inconvénient d'un faible taux de chargement puisqu'il faut injecter dix équivalents de lipides pour atteindre la concentration de traitement en cisplatine.

1.5.5.2 Les micelles polymériques

Les micelles polymériques sont constituées de copolymères séquencés amphiphiles qui s'auto-assemblent pour former une structure nanométrique comprise entre 100 et 300 nm. Le cœur des micelles est hydrophobe tandis que leur surface est hydrophile, ce qui permet l'encapsulation des anticancéreux hydrophobes.

Nishiyama *et al.* ont préparé des micelles polymériques incorporant du cisplatine à partir de la formation de liaisons de coordination entre les fonctions carboxyliques des glutamates

1.5. Vectorisation du cisplatine

d'un copolymère diblocs, poly(éthylène glycol)-poly(acide glutamique), et l'atome de platine (Figure 1.31) [334].

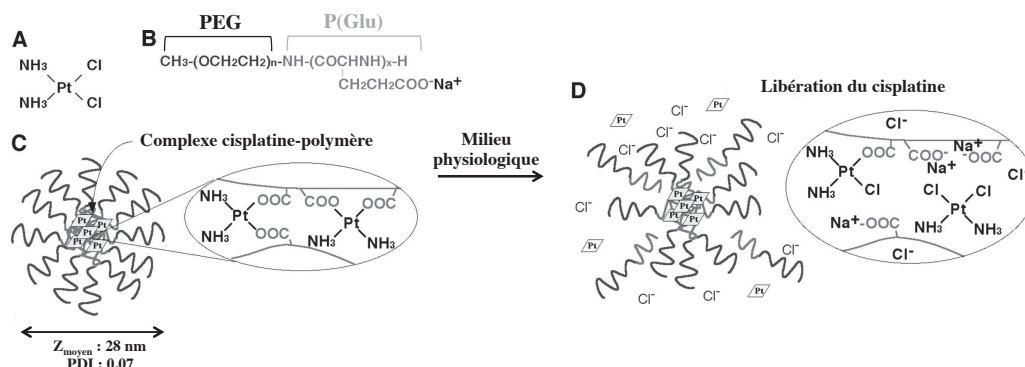


FIGURE 1.31 : Méthode de synthèse des micelles polymériques contenant le CDDP. **A)** Structure chimique du CDDP et **B)** du copolymère diblocs PEG-P(Glu), **C)** structure chimiques du nano-système CDDP-P(Glu)-PEG, **D)** libération du CDDP en milieu physiologique. D'après [334].

Ces nano-objets ont un diamètre hydrodynamique moyen de 28 nm et une distribution en taille étroite (PDI = 0,07). Le taux de platine incorporé est très élevé et est égal à 39% (m/m). Les nanoparticules sont stables dans l'eau déminéralisée mais se désagrègent rapidement en présence d'une forte concentration en ions chlorures (150 mM), régénérant ainsi le cisplatine (Figure 1.31). Après 8 heures dans le milieu sanguin, 60% de la dose injectée de platine est libérée des micelles. Néanmoins, une dose 20 fois supérieure à celle du cisplatine seul se retrouve au niveau des tissus tumoraux après 24 heures d'injection par voie intraveineuse.

1.5.5.3 Les nanoparticules de copolymère (PLGA-PEG)

Les nanoparticules de copolymère PLGA-PEG possèdent un cœur solide et sont composés d'un polymère hydrophobe, le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et d'un polymère hydrophile, le PEG. Dans ces cas, l'anticancéreux fait partie intégrante de la chaîne latérale du polymère.

Dhar *et al.* ont synthétisé une prodrogue à base de platine(IV) donnant lieu après réduction par des réductases du milieu intracellulaire au cisplatine (Figure 1.32) [254]. Cette prodrogue, plus hydrophobe que le cisplatine, est ensuite intégrée par précipitation à des nanoparticules de copolymère PLGA-PEG (Figure 1.32). La surface des nanoparticules est fonctionnalisée par un aptamère PSMA (protéine membranaire de type II) afin de cibler le domaine extracellulaire des cellules cancéreuses de la prostate. L'utilisation d'un composé plus hydrophobe que le cisplatine permet d'augmenter le taux d'encapsulation de 3% à 18% (m/m) [254, 335]. En fonction du pourcentage massique du précurseur Pt(IV), le diamètre hydrodynamique moyen passe de 132 à 172 nm, le PDI de 0,17 à 0,48 et le taux de chargement de 0,05 à 18,4%. Des tests de cytotoxicité *in vitro* réalisés sur des cellules épithéliales prostatiques montrent que les valeurs des concentrations inhibitrices 50 (IC₅₀) par rapport à la concentration en platine valent 0,03 - 0,13 et 2,4 μ M, respectivement pour les particules Pt-NPs-Apt, Pt-NPs et pour le précurseur Pt(IV).

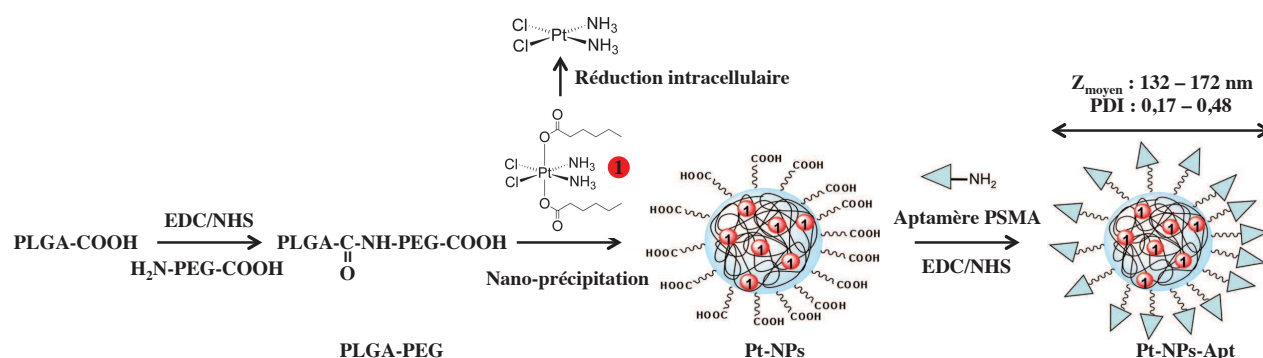


FIGURE 1.32 : Méthode de synthèse des nanoparticules de copolymère à base de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) et de PEG. Abréviations : PSMA, antigène membranaire prostatique spécifique; EDC, (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride); NHS, N-hydroxysuccinimide. D'après [254].

1.5.5.4 Les nanocapsules

L'étude de référence portant sur l'encapsulation du cisplatine dans des nanocapsules a été réalisée par Burger *et al.* en 2002 (Figure 1.33) [336]. Ces nanocapsules, formées par plusieurs cycles de chauffage (55 °C)-refroidissement (-70 °C) d'une solution aqueuse concentrée de cisplatine en présence d'un phospholipide chargé négativement (le 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphosérine, DOPS), présente un rapport **molaire** cisplatine/lipide exceptionnellement élevé et égal à 1100% (11/1).

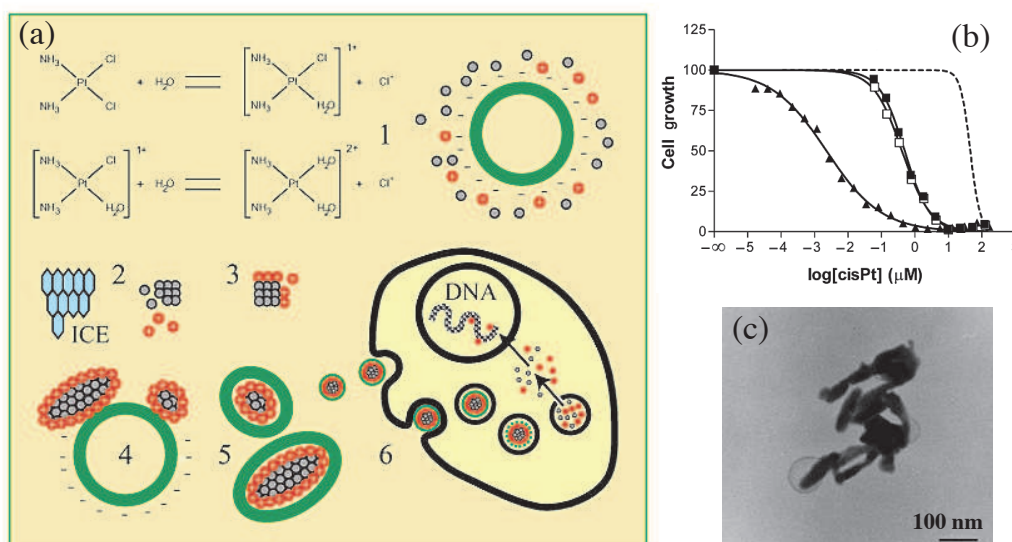


FIGURE 1.33 : (a) Mécanisme de formation et mode d'action des nanocapsules, (b) test de cytotoxicité sur des cellules du carcinome ovarien humain : triangle, nanocapsules; carré plein ou vide, cisplatine avec ou sans cycles de congélation et décongélation; pointillés, lipides, (c) image de cryomicroscopie électronique des nanocapsules. D'après [336].

Par rapport au cisplatine seul, l'activité cytotoxique *in vitro* de ces nanocapsules est mille fois supérieure. Leur concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) est égale à 2 nM, contre 0,5 μM pour le cisplatine seul (Figure 1.33(b)). Même sans PEGylation, ces nanocapsules présentent un temps de demi-vie plasmatique élevé, égal à 6,5 heures. L'image de cryo-microscopie de la

Figure 1.33(c) révèle des nanoparticules d'environ 100 nm de longueur. Le mécanisme de formation semble impliquer les espèces native, mono- et di-aqua du cisplatine ainsi que leur interaction électrostatique avec le phospholipide chargé négativement, le DOPS. Au cours des cycles de chauffage-refroidissement, les espèces hydratées (plus solubles que les espèces natives) se trouvent dans l'eau liquide résiduelle, tandis que les espèces natives se retrouvent dans l'eau congelée. Ainsi, des agrégats de cisplatine sont formés progressivement puis piégés par les nanocapsules (Figure 1.33(a)). A l'intérieur des nanocapsules, le cisplatine est présent à 90% sous sa forme native. Ces formulations ne sont en revanche pas stables dans le sérum de souris puisque 80% du cisplatine se retrouve dans le sérum après 1 minute d'incubation à 37 °C [337].

1.5.6 État de l'art sur la vectorisation du cisplatine par les MSNs

Comme nous l'indiquions en section 1.5.2, très peu d'études portent sur l'encapsulation du cisplatine dans les nanoparticules mésoporeuses de silice. Dans cette partie, nous détaillons ces quelques travaux.

Tao *et al.* ont étudié la cytotoxicité d'une suspension de cisplatine contenant des microparticules de SBA-15 et MCM-41 [338]. Après 24 heures de traitement sur des cellules leucémiques, la viabilité cellulaire du cisplatine seul est de $6,9 \pm 13,3\%$ tandis qu'avec la même concentration en cisplatine, la viabilité cellulaire des microparticules « chargées » est proche de zéro. Après avoir observé par microscopie électronique, l'internalisation de ces microparticules sur ces mêmes cellules, les auteurs concluent que l'amélioration des effets cytotoxiques de 10% du cisplatine « chargés » provient de sa localisation intracellulaire, donc d'un effet de synergie dû à la présence des microparticules.

Arean *et al.* ont étudié les propriétés d'adsorption et de libération du cisplatine de sphères de MCM-41 d'environ 800 nm de diamètre fonctionnalisées par des groupements amines (MCM-41-NH₂) et carboxyliques (MCM-41-COOH) [139]. Le taux de chargement des particules non fonctionnalisées est inférieur à celui des particules fonctionnalisées. Ils valent respectivement 6,1 - 1,5 et 0,9% ($m_{\text{CDDP}}/m_{\text{échantillon}}$) pour les échantillons MCM-41-NH₂ - MCM-41-COOH et MCM-41. Les profils de libération dans une solution isotonique de NaCl montrent que seulement 20% de la quantité totale de CDDP est libérée pour l'échantillon MCM-41-NH₂, tandis que ce pourcentage est égal à 57% pour l'échantillon MCM-41-COOH.

Très récemment, Gu *et al.* [15] ont fonctionnalisé en deux étapes la surface des canaux de MSNs d'environ 100 nm de diamètre par des groupements carboxyliques (Figure 1.34) capables de former un complexe avec le CDDP après le départ des ligands chlorures (Figure 1.35) [339–341]. Avec un taux de fonctions carboxyliques égal à 0,96 COOH/nm², ces auteurs montrent qu'il est possible d'obtenir par adsorption d'une solution de CDDP à 1 mg/mL (eau-diméthylsulfoxyde ; 1/1 ; v/v) pendant 24 heures, un taux de chargement de 20% (m/m) ($m_{\text{CDDP}}/m_{\text{totale}}$).

Sur les lignées cancéreuses HeLa et MCF-7, les concentrations inhibitrices 50 (IC₅₀) après 48 heures de traitement par les MSNs-COOH « chargées » en CDDP sont égales respectivement

à 7,4 et 28,6 μM , tandis qu'elles valent 17,7 et 36,5 μM pour le CDDP seul.

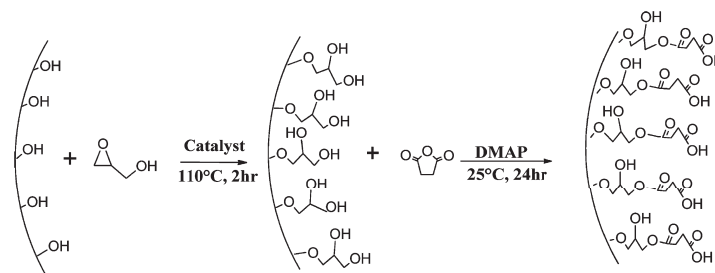


FIGURE 1.34 : Procédures de fonctionnalisation en deux étapes des MSNs par des groupements carboxyliques. D'après [15].

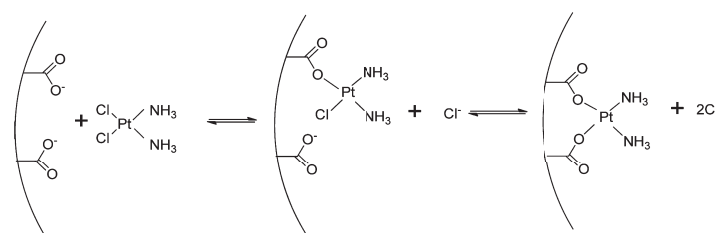


FIGURE 1.35 : Mécanisme de formation proposé pour le complexe formé entre le CDDP et les groupements carboxyliques présents en surface des canaux des MSNs. D'après [15].

En 2013, les mêmes auteurs ont rapporté la synthèse *one-pot* de nanoparticules mésoporeuses de silice d'environ 80 nm de diamètre et fonctionnalisées par des groupements carboxyliques en utilisant la méthode de greffage par co-condensation du TEOS et d'un sel de sodium de carboxyéthylsilanetriol (CEST) [342]. Par adsorption d'une solution de CDDP à 1 mg/mL (eau-diméthylsulfoxyde ; 1/1 ; v/v) pendant 24 heures à 45 °C, les taux de platine augmentent de 5,9 à 11,3% ($m_{\text{Pt}}/m_{\text{totale}}$) lorsque le rapport molaire CEST/TEOS augmente de 0,047 à 0,14.

1.6 Conclusion

Les matériaux mésoporeux à base de silice présentent des propriétés physico-chimiques (volume poreux, surface spécifique, surface des pores fonctionnalisable) bien adaptées à la vectorisation de substances actives. Pour administrer par voie intraveineuse une concentration en médicament la plus élevée possible au niveau des cellules tumorales, ces matériaux doivent se présenter sous la forme de nanoparticules (appelées MSNs) dont la taille doit être comprise entre 60 nm et 150 nm. Bien que de nombreuses stratégies de synthèse des MSNs aient été développées à ce jour, la méthode de Cai *et al.* [100] reste la plus utilisée dans la littérature car elle est facile à mettre en œuvre et elle permet d'avoir des rendements élevés [15, 276, 295, 343, 344]. Pour autant, l'influence des paramètres de synthèse sur les propriétés structurales et morphologiques des nanoparticules n'a pas été établie de façon détaillée. De surcroît, certains points fondamentaux restent encore à éclaircir, notamment ceux qui gouvernent la stabilité colloïdale des suspensions après synthèse.

Pour contrôler l'affinité chimique de la matrice inorganique pour le médicament et ainsi opti-

mettre son taux d'encapsulation ou pour assurer la stabilité colloïdale des nanoparticules en milieu physiologique, il est indispensable de modifier la chimie de surface de ces nano-objets. Cette étape de fonctionnalisation peut être réalisée suivant deux voies principales : la post-fonctionnalisation ou la co-condensation. Par cette dernière approche, la distribution des groupements organiques présents dans les canaux est plus uniforme et la redispersion des nanoparticules plus aisée. De plus, elle présente l'avantage de préserver la mésostructure à faible taux de fonctionnalisation, ce qui peut permettre un meilleur contrôle de la cinétique de libération de l'anticancéreux. Cette méthode de modification de surface sera donc utilisée par la suite pour incorporer des greffons organiques au sein des MSNs. Le greffage de polymères permettant d'améliorer la stabilité colloïdale des nanoparticules dans des conditions physiologiques sera quant à lui envisagé par post-fonctionnalisation.

Le cisplatine est une molécule peu soluble dans l'eau ou dans la plupart des solvants organiques. C'est peut-être la raison pour laquelle peu de nanovecteurs, principalement des vecteurs macromoléculaires, sont proposés à ce jour.

Chapitre 2

Synthèse et cytotoxicité *in vitro* des nanoparticules mésoporeuses de silice

Comme nous l'évoquions dans la première partie de ce manuscrit, la taille des nanoparticules est un paramètre décisif dans leur devenir en milieu biologique. Le contrôle de la taille des nanoparticules passe par la maîtrise et la compréhension des conditions de préparation des nano-objets. Malgré les nouvelles stratégies de synthèse développées ces dernières années, la méthode proposée par Cai *et al.* semble être la plus utilisée et la plus reprise dans la littérature de par sa facilité de mise en œuvre [276, 295, 343, 344]. Néanmoins, les études paramétriques systématiques basées sur ce protocole sont absentes de la littérature. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant d'étudier, dans un premier temps, l'effet sur les propriétés physico-chimiques des MSNs de quelques paramètres expérimentaux tels que la concentration en soude, la température de synthèse et la vitesse d'agitation. L'influence du mode d'extraction et du mode de conservation (lyophilisation, humidité) a également attiré notre attention. La méthode de synthèse proposée par Cai *et al.* ne permettant pas d'obtenir une suspension colloïdale de MSNs parfaitement dispersées après synthèse, nous avons cherché dans un second temps, à améliorer ce protocole dans le but d'obtenir une suspension stable après synthèse d'un point de vue colloïdal, mais aussi stable après extraction d'un point de vue structural. Pour finir, afin de vérifier l'innocuité de ces nanoparticules vis-à-vis des cellules, des tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés sur des cellules cancéreuses en culture.

2.1 Influence des conditions opératoires de synthèse sur les propriétés morphologiques et structurales des MSNs

Dans cette partie, les effets sur les propriétés physico-chimiques des MSNs de la concentration en soude (5 mM - 27,5 mM), de la température de synthèse (50 °C - 90 °C) et de la vitesse d'agitation (150 rpm - 900 rpm) sont étudiés.

2.1.1 Protocole « standard » issu de la méthode de Cai *et al.*

2.1.1.1 Réactifs utilisés

Les synthèses décrites ci-dessous ont nécessité les produits chimiques suivants : du tétraéthoxysilane $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS, $M_W = 208,33 \text{ g.mol}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH, CAS 78-10-4, 99%) comme source de silice, du bromure de cétyltriméthylammonium $(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ (CTAB, $M_W = 364,45 \text{ g.mol}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH, CAS 57-09-0, 99%) comme tensioactif cationique et une solution d'hydroxide de sodium NaOH à 2M ($M_W = 40,00 \text{ g.mol}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH, CAS 1310-73-2, 7,3% (m/m), volumetric) comme catalyseur, du nitrate d'ammonium NH_4NO_3 ($M_W = 80,04 \text{ g.mol}^{-1}$, FISHER CHEMICALS, CAS 6484-52-2, 98%) et de l'acide chlorhydrique HCl ($M_W = 36,46 \text{ g.mol}^{-1}$, FISHER CHEMICALS, CAS 7647-01-0, 36-38%) pour l'extraction du tensioactif. Tous ces produits ont été utilisés sans purification supplémentaire. La synthèse et les étapes de purification ont demandé les solvants suivants : de l'eau ultra-pure (MilliQ, $18 \text{ M}\Omega\text{.cm}$) et de l'éthanol technique (95%).

2.1.1.2 Procédure expérimentale

Les nanoparticules sont synthétisées en suivant la méthode de Cai *et al.* [100]. Par la suite, nous y ferons référence en utilisant le terme « **standard** ». Dans la procédure établie par Cai *et al.*, 416,6 mg de CTAB (1,14 mmol) sont dissous dans 200 mL d'eau ultra pure. Le mélange est ensuite placé dans un ballon quadricol à fond rond de 500 mL. Avant d'être porté à 70°C sous agitation, 1,45 mL de solution de NaOH standard à 2M (2,90 mmol) sont ajoutés au mélange. Après deux heures, 2,008 mL de TEOS (8,99 mmol) sont ajoutés à une vitesse constante de 1 mL/min. Environ 2 minutes après le début de l'ajout, un précipité blanc se forme. Après deux nouvelles heures, le mélange biphasique, qui dans ces conditions de synthèse « sédimente », est dilué deux fois avec de l'eau déminéralisée ($14 \text{ M}\Omega\text{.cm}$) puis lavé par ultrafiltration (Millipore, 30 KD) avec de l'eau déminéralisée et de l'éthanol jusqu'à ce que la conductivité des eaux de lavage soit inférieure à $10 \mu\text{S/cm}$. Le solvant est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif à 80°C . Afin de parfaire l'évaporation, la poudre est maintenue à 90°C sous vide pendant 1 heure. Dans le but de libérer la porosité, l'agent structurant est éliminé par calcination en plaçant la poudre (600 mg) à 550°C pendant 8 heures (rampe = 1°C/min) sous flux d'air (qualité α_1), avec un débit de 0,5 L/min.

2.1.2 Influence de la concentration en NaOH initial $[\text{NaOH}]_i$

2.1.2.1 Conditions opératoires et techniques de caractérisations

Afin d'étudier l'effet de la concentration en soude sur les propriétés morphologiques et structurales des MSNs, une gamme de concentration **très étroite** est choisie. En considérant

la composition molaire des réactifs égale à $n\text{NaOH}/1\text{TEOS}/0.127\text{C}_{16}\text{TAB}/1235\text{H}_2\text{O}$ ¹, on fait varier n de 0,11 à 0,62, ce qui correspond à des volumes de soude de 501 μL à 2530 μL , soit des concentrations molaires variant de **5 mM à 27,5 mM** avec un incrément de **2,5 mM**. Pour toutes les compositions, la température de synthèse et la vitesse d'agitation sont fixées à 70 °C et 700 rpm, respectivement. Afin de travailler dans les mêmes conditions de carbonatation, la soude est prélevée à chaque fois sous boîte à gants (N_2). Le pH de la solution basique de tensioactif est relevé à 70 °C avant l'ajout du TEOS (Hanna® instruments, pH 210 Microprocessor pH Meter, Electrode pH alcalin). Pour ce faire, le pH-mètre est étalonné à 25 °C avec deux solutions tampon de 7,01 et 10,01. Au regard de l'incrément choisi (2,5 mM) et de la gamme étroite de concentration, il est capital d'accorder une grande importance aux mesures de pH. C'est pourquoi, pour chaque mesure, le coefficient directeur de la droite représentant le potentiel en fonction du pH est contrôlé de manière à correspondre à ce qui est habituellement accepté, *i.e.* 95%-105% de la valeur théorique fixée à 59,16 mV/unité de pH à 25 °C. La mesure du pH est ensuite effectuée en plongeant l'électrode de pH et la sonde de température dans la solution *via* les cols du ballon. La valeur est relevée après stabilisation de la valeur du pH (équilibre de l'électrode à 70 °C). Les conditions opératoires sont récapitulées dans le Tableau 2.1. Le dispositif expérimental est présenté sur la Figure 2.1.

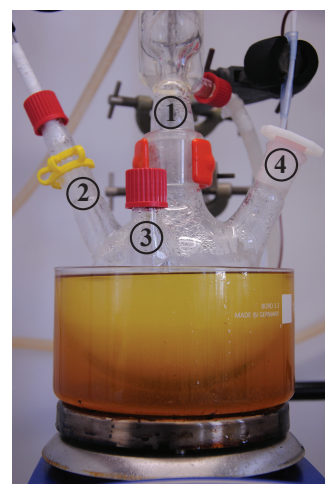


FIGURE 2.1 : *Dispositif expérimental. ① Un ballon à fond rond à quatre cols avec un réfrigérant est placé dans un bain d'huile dont la température est directement contrôlée par un thermocouple. ② Si nécessaire, un flux de gaz peut être ajouté à travers le col. La température et le pH sont mesurés à travers les cols ③ et ④. Le TEOS est injecté via une seringue placée sur le col ④ et dont la vitesse d'injection est contrôlée par un pousse-seringue.*

TABLEAU 2.1 : *Données récapitulatives des valeurs de pH et de température relevées avant l'ajout du TEOS pour les différentes concentrations en soude étudiées. Les données expérimentales de la synthèse « standard » sont données en rouge.*

$[\text{NaOH}]_i$ (mM)	5,0	7,5	10,0	12,5	14,4	17,5	20,0	22,5	25,0	27,5
pH	10,7	10,9	11,1	11,2	11,2	11,3	11,4	11,5	11,5	11,6
Température (°C)	73,0	71,8	72,9	72,1	72,0	72,8	73,4	72,4	72,8	72,0

Le diamètre hydrodynamique moyen des particules, d_{DDL} (Z_{average}), est mesuré par Diffusion Dynamique de la Lumière (DDL) (Annexe C) également appelée Spectroscopie à Corrélation de Photon (PCS). Les mesures sont réalisées sans attendre après 2 heures de synthèse en utilisant

1. Les quantités d'eau contenues dans les solutions de NaOH n'ont pas été prises en compte dans le calcul du nombre de moles d'eau.

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

des conditions de dilution appropriées (en terme de nombre de coups, position et atténuateur) et après ultrasonication (20 secondes à 70% d'amplitude de la canne (Sonics[®], Vibra-Cell[™], VCX750)). Afin d'éviter le phénomène de diffusion multiple et de manière à travailler dans des conditions où la force ionique est constante, les particules sont redispersées dans une solution de NaCl à 10^{-3} M avec un taux de dilution de 25. Chaque mesure est réalisée trois fois. Les valeurs présentées dans le manuscrit correspondent à la moyenne de ces trois mesures.

La morphologie et la mésostructure des matériaux obtenus sont aussi caractérisées par Microscopie Electronique en Transmission (MET) (Annexe F). Les échantillons sont préparés en immergeant la grille de cuivre dans les suspensions de particules diluées à l'éthanol (taux de dilution de 50 par rapport à la synthèse). Avant immersion de la grille, les suspensions sont redispersées à la canne à ultrasons pendant 1 minute à 70% d'amplitude. Le solvant est évaporé à l'air ambiant. La taille MET, notée d_{MET} , est le résultat d'un comptage réalisé sur environ 70 particules et est calculée à partir de la distribution en intensité ($d_{\text{MET}} = \sum_i d_i^6 / \sum_i d_i^5$).

Les propriétés structurales et texturales des matériaux obtenus sont déterminées par sorption d'azote à 77K (Annexe A) et par Diffraction des Rayons X (DRX) (Annexe B). La surface spécifique (S_{BET}) est calculé entre les pressions relatives P/P_0 de 0,06 et 0,25. La distribution de la taille des pores (D_p) et le volume mésoporeux (V_m) sont calculés à partir de la branche de désorption en utilisant la méthode de Barret-Joyner-Halenda (BJH) pour des pressions relatives $P/P_0 \leq 0,75$. Le volume adsorbé total (V_t) est calculé quant à lui à partir du dernier point de mesure sur la branche d'adsorption de l'isotherme. Avant la mesure, environ 100 mg de poudre sont dégazés à 350 °C pendant 4 heures.

Les rapports molaires $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ et les degrés de condensation D_{cond} sont déterminés respectivement par Analyse ThermoGravimétrique (ATG) (Annexe F) et par Résonance Magnétique Nucléaire du Silicium (RMN ^{29}Si) (Annexe E.1).

2.1.2.2 Propriétés morphologiques des matériaux obtenus

Sur la Figure 2.2, les images MET montrent l'évolution de la morphologie en fonction de la concentration en soude. Pour une gamme de concentration de 5 mM à 10 mM, les matériaux sont constitués d'agrégats de nanoparticules primaires pseudo-sphériques et poreuses dont les structures tridimensionnelles résultantes s'apparentent à des gels de silice. Comme le montrent les images MET de la Figure 2.2, ces structures donnent lieu à des espaces vides dont les tailles sont très variables et qui peuvent générer une seconde forme de porosité. Pour des concentrations égales à 5, 7,5 et 10 mM, les tailles obtenues par comptage MET augmentent et valent respectivement 28, 42 et 65 nm (Tableau 2.2).

Comme le montrent les Figures 2.2 et 2.3, les particules sont moins agrégées pour des concentrations supérieures à 10 mM. Lorsque la concentration en soude augmente de 12,5 à 27,5 mM, la taille MET des particules augmente de 93 à 837 nm (Tableau 2.2). Dans les conditions de synthèse « standards », la taille des particules est située dans cet intervalle et est

égale à 122 nm. La distribution en taille s'élargit également lorsque la concentration augmente puisque le coefficient de variation (c_v) passe de 0,14 à 0,18. Cet élargissement de la distribution en taille est aussi clairement visible sur les clichés de microscopie de la Figure 2.2.

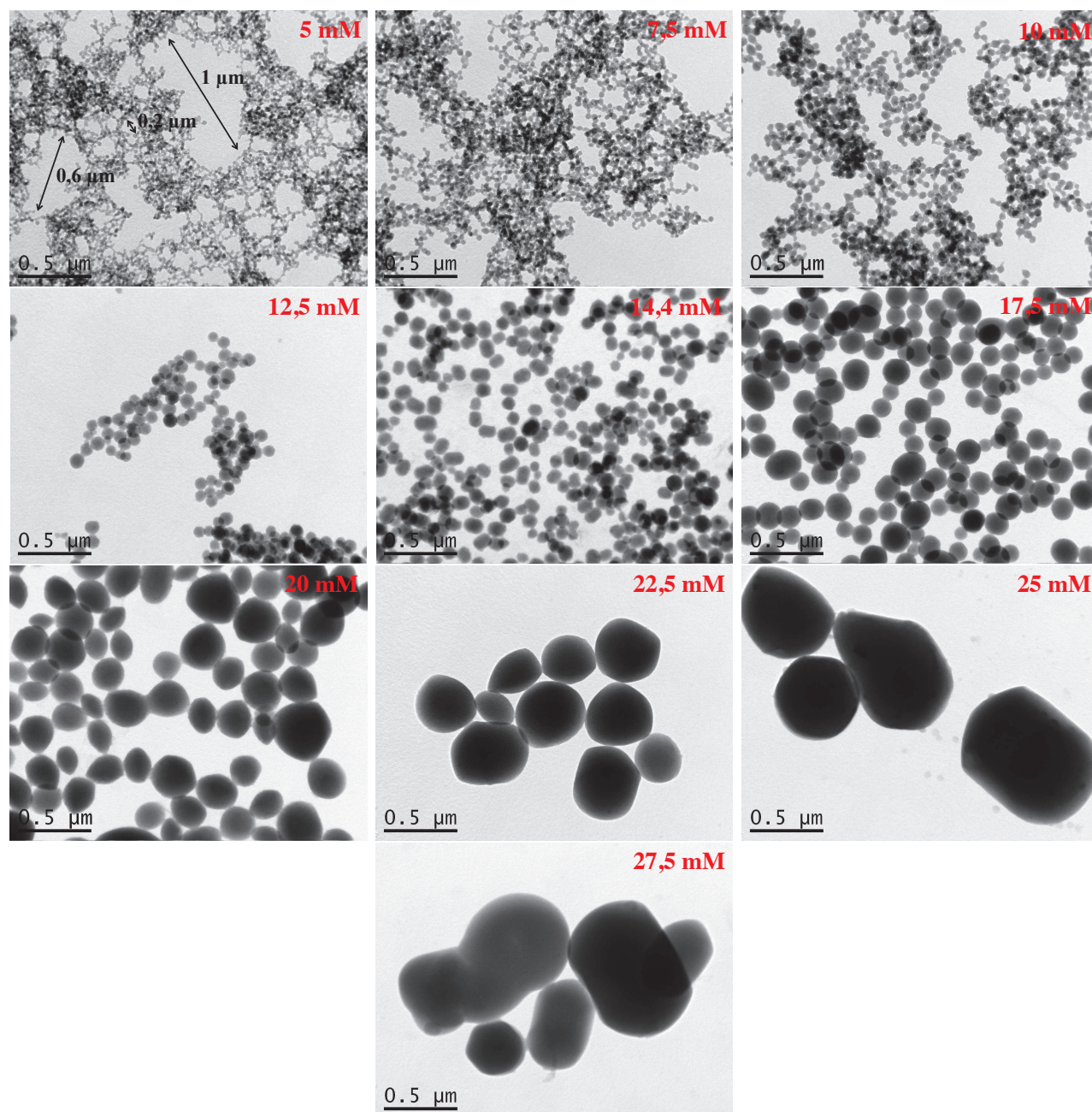


FIGURE 2.2 : Images MET montrant l'évolution de la morphologie des matériaux obtenus en fonction de la concentration en soude. Les tailles des espaces vides ne sont données qu'à titre indicatif.

Les diamètres hydrodynamiques moyens des particules (d_{DDL}) et les Indices de PolyDispersité (PDI) associés sont indiqués dans le Tableau 2.2. Lorsque la concentration en soude passe de 7,5 mM à 12,5 mM, le diamètre hydrodynamique d_{DDL} diminue. De manière générale, la taille moyenne obtenue en DDL est toujours beaucoup plus grande que celle observée par microscopie car l'intensité diffusée donne « plus de poids » aux plus grosses particules (Annexe C). Malgré toutes ces considérations, les diamètres obtenus en DDL pour les plus faibles concentrations en soude sont bien trop élevés (tout comme les PDIs) par rapport à ceux déterminés par comptage

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

MET. La seule explication possible est la présence d'agrégats de particules en suspension, ce qui est confirmé par la microscopie (Figure 2.3).

Pour une concentration en soude comprise entre 14,4 et 25 mM, le diamètre d_{DDL} augmente de 218 nm à 937 nm. Lorsque la concentration est égale à 25 mM, le diamètre hydrodynamique mesuré est bien plus grand que celui déterminé par microscopie. Au vue des clichés MET, un tel résultat ne peut être expliqué par de l'agrégation interparticulaire. Dans ce cas, cette différence peut être interprétée par une légère sédimentation des particules en solution ainsi que par une distribution en taille très large et la présence de particules dont une des longueurs caractéristiques est d'environ 1 μm . Cette hypothèse est confirmée par le fait que la mesure n'a pu être réalisée pour la concentration de 27,5 mM car les particules sédimentaient rapidement.

TABLEAU 2.2 : *Propriétés morphologiques des matériaux obtenus pour des concentrations initiales en NaOH de 5,0 à 27,5 mM. ^a d_{DDL} : Diamètre hydrodynamique des particules déterminé par DDL à partir de la méthode des cumulants (taille moyenne harmonique pondérée en intensité, voir Annexe C). Le diamètre est la moyenne des valeurs obtenues pour trois mesures ; ^bPDI : Indice de PolyDispersité (PDI) ; ^c d_{TEM} : Taille moyenne en intensité des particules obtenues par comptage MET ($\sum d_i^6 / \sum d_i^5$). Pour chaque échantillon, 70 comptages ont été réalisés ; ^d c_v : Coefficient défini par $c_v = \sigma/d_{MET}$ où σ est l'écart type de la distribution en taille. Les particules sont monodisperses si $c_v = 0$; ND : Non Déterminé à cause de la sédimentation des particules.*

$[\text{NaOH}]_i$ (mM)	d_{DDL}^a (nm)	PDI ^b	d_{MET}^c (nm)	c_v^d
5,0	ND	ND	28	0,14
7,5	331	0,33	42	0,12
10,0	225	0,26	65	0,12
12,5	211	0,14	93	0,14
14,4	218	0,11	122	0,17
17,5	251	0,14	208	0,26
20,0	278	0,13	290	0,19
22,5	426	0,23	460	0,22
25,0	937	0,37	787	0,27
27,5	ND	ND	837	0,18

L'évolution des valeurs de l'indice de polydispersité en fonction de la concentration en soude rend bien compte de l'état de dispersion des nanoparticules en suspension. En effet, lorsque la concentration en soude est inférieure à 10 mM, les valeurs des PDIs sont élevées, caractérisant ainsi les structures mal définies obtenues à ces concentrations. Entre 12,5 mM et 20 mM, les valeurs de PDI sont raisonnablement inférieures à 0,15, révélant ainsi des nano-objets dont les distributions en taille sont monodisperses. A partir de 22,5 mM, les valeurs de PDI sont grandes, révélant des nano-objets dont les distributions en taille sont larges, ce qui est confirmé par les images MET de la Figure 2.2.

Sur la Figure 2.3, les images MET montrent l'évolution de la structure interne des particules. Pour une concentration en soude de 5 mM, la structure interne des particules semble être désordonnée et des résultats similaires sont observés pour la concentration de 7,5 mM (non montrés). A partir de 10 mM en soude, la structure interne hexagonale des particules commence à être visible. A 14,4 mM en soude, l'orientation parallèle des canaux est bien observée. Pour une concentration de 20 mM, l'arrangement hexagonal des canaux semble bien défini. Pour des concentrations supérieures, la structure interne ne peut être observée car les particules sont trop volumineuses.

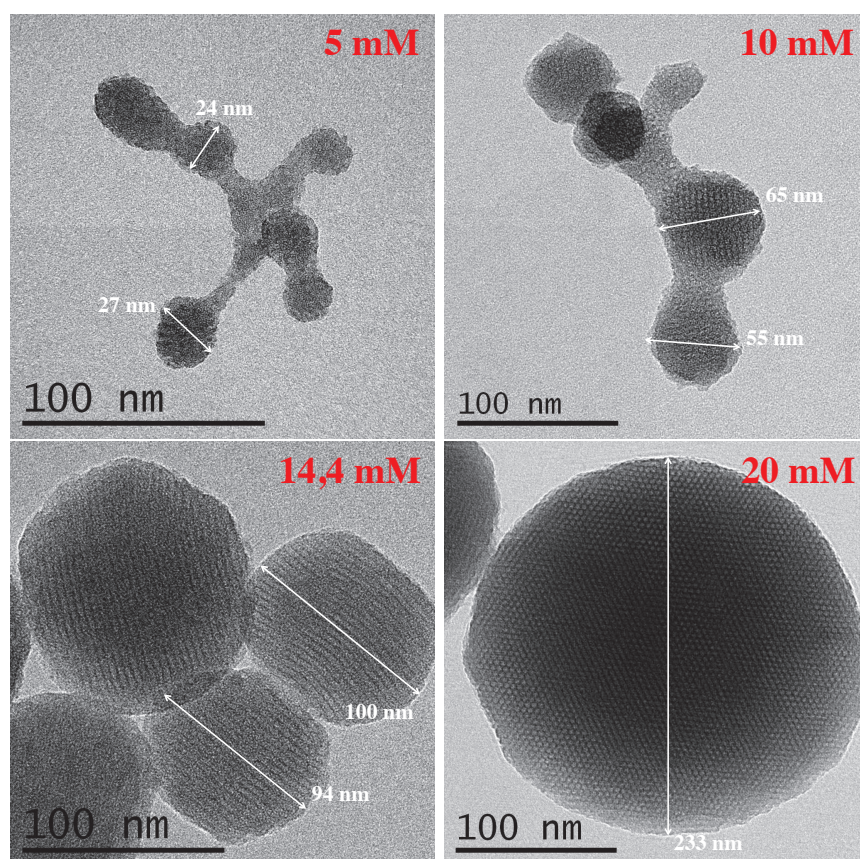


FIGURE 2.3 : Images MET obtenues à des plus forts grossissements montrant ainsi l'évolution de la mésostructure des matériaux obtenus pour des concentrations en soude de 5, 10, 14,4 et 20 mM. Les mesures de la taille de quelques particules sont également indiquées.

2.1.2.3 Propriétés structurales des matériaux obtenus

Les diffractogrammes des échantillons calcinés pour des concentrations en soude de 5 à 27,5 mM sont présentés sur la Figure 2.4(a). Lorsque la concentration en soude varie, différentes mésostructures sont observées. Entre 12,5 mM et 22,5 mM, les diffractogrammes montrent quatre pics de Bragg qui correspondent aux plans (100), (110), (200) et (210), caractéristiques de la géométrie hexagonale bidimensionnelle $P6mm$ des matériaux mésoporeux de type MCM-41 [30]. L'échantillon « standard » est situé dans cette zone de concentration. Les particules synthétisées dans ces conditions sont donc bien de type MCM-41. Dans cette gamme de concentration, l'échantillon synthétisé pour une concentration de 20 mM présente le plus haut degré d'ordre interne. En effet, c'est pour cette concentration que le pic (100) est le plus étroit et le plus intense. De plus, les intensités relatives des pics (110), (200) et (210) présentent un maximum pour cette concentration et un autre pic correspondant un plan (300) apparaît à $2\theta = 6,9^\circ$ (Figure 2.4(b)), indiquant ainsi une structure à longue distance mieux ordonnée. Pour des concentrations intermédiaires de 10 mM et 25 mM, les diffractogrammes montrent qu'il existe toujours trois pics de diffraction mais beaucoup moins bien définis. En dessous de 10 mM et au-dessus de 25 mM, les diffractogrammes ne montrent plus qu'un seul pic de diffraction, ce qui implique un réseau poreux vermiculaire ou une distribution de taille de pores très large [36, 345]. Contrairement à un réseau poreux bidimensionnel hexagonal où les réseaux sont ordonnés à

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

longue distance, un réseau poreux vermiculaire présente une périodicité à plus courte distance, c'est à dire que la seule périodicité est la distance entre le centre de deux pores adjacents.

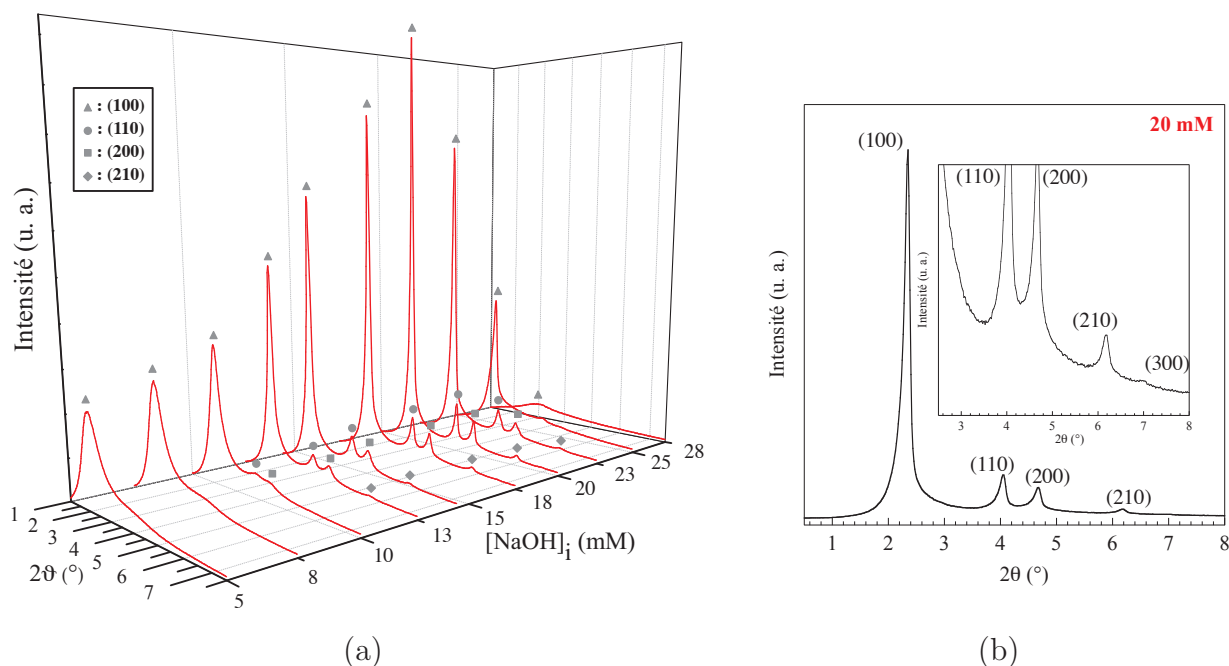


FIGURE 2.4 : (a) Diffractogrammes des poudres calcinées et synthétisées pour des concentrations en soude de 5 mM à 27,5 mM. (b) Diffractogramme de l'échantillon calciné synthétisé à une concentration en soude de 20 mM.

Sur le graphique de la Figure 2.5, les diagrammes de diffraction enregistrés avant et après calcination des échantillons synthétisés à des concentrations en soude de 14,4 et 27,5 mM sont présentés. Contrairement à l'échantillon synthétisé à 14,4 mM en soude, l'échantillon synthétisé à 27,5 mM présente un pic de diffraction beaucoup plus large après calcination, ce qui indique qu'une partie de la structure s'est effondrée. Cela est caractéristique des matériaux mésoporeux dont le degré de polymérisation et l'épaisseur des murs sont faibles [162, 346].

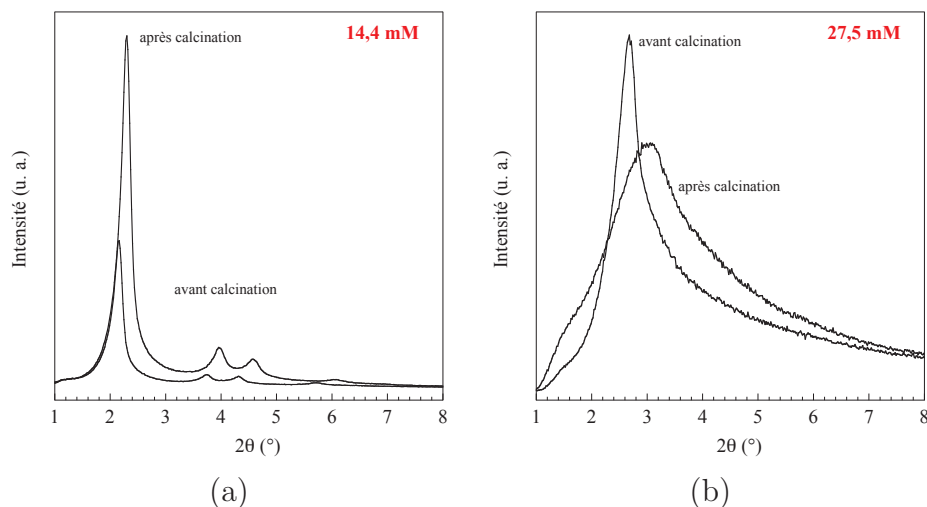


FIGURE 2.5 : Diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés à des concentrations en soude de (a) 14,4 et (b) 27,5 mM. Les analyses ont été réalisées soit après synthèse, soit après calcination.

Sur la Figure 2.6, une cartographie des intensités des pics de diffraction en fonction de la concentration en soude et de l'angle 2θ est présentée. L'évolution des paramètres structuraux avec la concentration en soude est indiquée dans le Tableau 2.3.

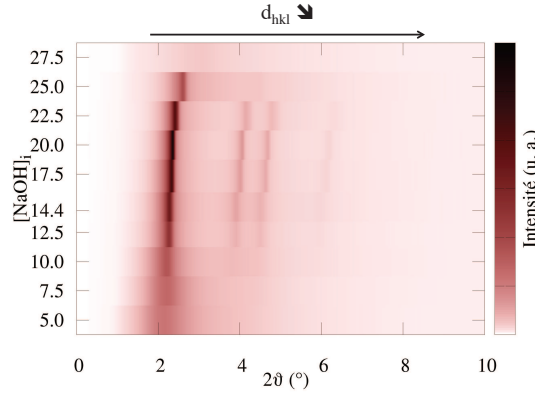


FIGURE 2.6 : Cartographie des intensités des pics en fonction de la concentration en soude et de l'angle 2θ .

TABLEAU 2.3 : Tableau récapitulatif des paramètres structuraux des matériaux synthétisés pour des concentrations en soude de 5 à 27,5 mM.

[NaOH] _i (mM)	5,0	7,5	10,0	12,5	14,4	17,5	20,0	22,5	25,0	27,5
d_{calc}^a (nm)	4,12	4,03	4,02	3,92	3,85	3,82	3,79	3,68	3,42	2,91
a_0^b	4,76*	4,65*	4,64	4,53	4,44	4,41	4,38	4,25	3,95	3,37*
e^c	1,5	1,6	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,4	1,2

^a d_{calc} : distances de corrélation après calcination correspondant au plan (100) pour toutes les gammes de concentration en soude. ^b $a_0 = 2d_{\text{calc}}/\sqrt{3}$. ^c e : épaisseur du mur de silice égale $a_0 - D_p$ où D_p est le diamètre des pores obtenu par la méthode de Barret-Joyner-Halenda (BJH) et calculé sur la branche de désorption (présenté dans la partie suivante). En rouge, les résultats correspondant à la synthèse « standard » sont indiqués. * Ces valeurs sont à prendre avec précaution puisqu'en théorie, la distance centre à centre a_0 ne peut être calculée pour ces échantillons car le réseau est vermiculaire.

Avec la concentration en soude, les positions des différents pics sont déplacées vers des angles 2θ plus grands, ce qui indique que la distance de corrélation du plan (100), notée d_{calc} dans le Tableau 2.3 diminue drastiquement. Cette distance passe de 4,12 nm à 2,91 nm lorsque la concentration en soude augmente de 5 mM à 27,5 mM. La distance centre à centre a_0 , définie par $2d_{\text{calc}}/\sqrt{3}$ pour un arrangement hexagonal, rend bien compte de cette évolution car elle diminue de 4,76 nm à 3,37 nm. Il faut noter ici que cette définition a été aussi appliquée lorsque des réseaux vermiculaires sont observés. Dans ces cas, les valeurs a_0 doivent être prises avec précaution. La taille du mur de silice n'évolue pas avec la concentration en soude et reste égale à environ 1,5 nm à l'exception de la concentration en soude de 27,5 mM (Tableau 2.3). Cette valeur est caractéristique des matériaux de type MCM-41 [152].

2.1.2.4 Propriétés texturales des matériaux obtenus

Sur la Figure 2.7, les isothermes de sorption de N_2 des échantillons synthétisés à des concentrations en soude de 5 à 27,5 mM sont présentés. La taille des pores D_p , le volume

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

poreux total V_t , le volume mésoporeux V_m et la surface spécifique S_{BET} sont résumés dans le Tableau 2.4.

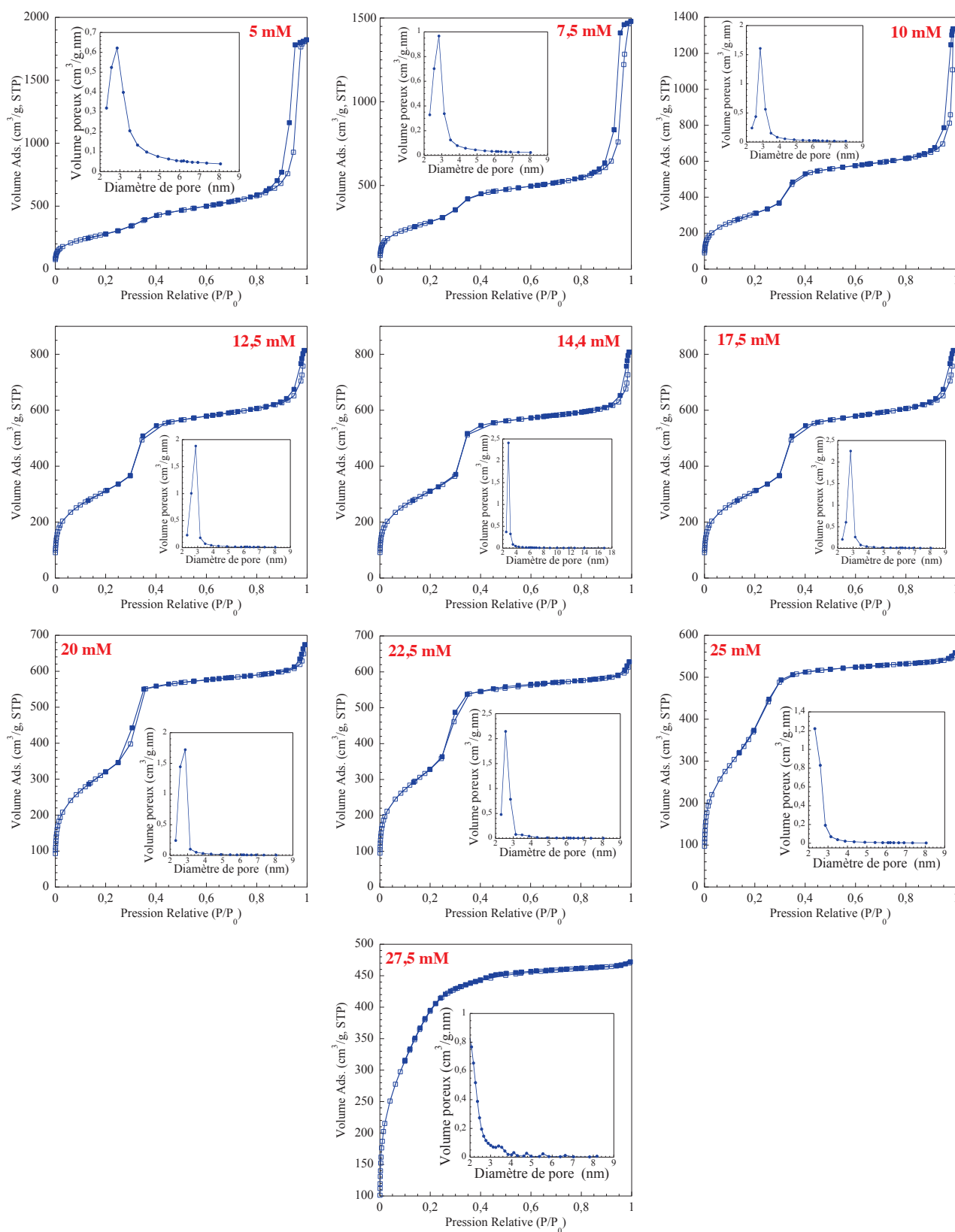


FIGURE 2.7 : Isothermes de sorption de N_2 et distributions des pores d'après la méthode BJH pour les échantillons synthétisés avec des concentrations en soude de 5 à 27,5 mM. Symboles vides : branche d'adsorption ; Symboles pleins : branche de désorption.

Les isothermes obtenues pour toutes les concentrations présentent deux marches de condensation capillaire et peuvent être considérées comme étant de type IV, en accord avec la classification Brunauer, Deming, Deming and Teller (BDDT) [347, 348] et la nomenclature de l'IUPAC [349]. La première marche à environ $P/P_0 = 0,3$ et la seconde à $P/P_0 > 0,9$ sont dues à la présence de mésoporosité intra-particulaire et de porosité inter-particulaire, respectivement. Pour des concentrations inférieures ou égales à 10 mM, la seconde marche à $P/P_0 > 0,9$, attribuée à l'espace vide entre les particules (observée en microscopie), est conséquente. En effet, le volume inter-particulaire, défini par $V_t - V_m$, est à peu près nul pour des concentrations supérieures à 10 mM, tandis qu'il augmente et passe de 0,20 à 1,90 cm³/g lorsque la concentration en soude diminue de 10 à 5 mM. Ce type de matériaux est caractéristique des systèmes bi-modaux, déjà observés par plusieurs groupes [350, 351]. Les isothermes des échantillons synthétisés pour des concentrations comprise entre 12,5 et 22,5 mM sont typiques des matériaux de type MCM-41 présentant une isotherme réversible de type IV avec peu ou pas d'hystérésis à environ $P/P_0 = 0,3$ et quasiment pas de porosité inter-particulaire [152].

Lorsque la concentration en soude augmente de 25 à 27,5 mM, les isothermes évoluent progressivement du type IV vers le type I. A la concentration de 27,5 mM, l'isotherme montre clairement une région linéaire de $P/P_0 = 0,1$ jusqu'à 0,2, indiquant la présence de supermicro-porosité [76, 352]. Ce comportement a déjà été observé par Voegtlin *et al.* dans le cadre de la synthèse à température ambiante de matériaux mésoporeux de type MCM-41 [64]. Cette isotherme est caractéristique des matériaux mésoporeux dont la taille des pores est proche de celle des micropores ou bien indique un certain élargissement de la distribution en taille des mésopores [353]. Cette dernière hypothèse est corroborée par les résultats du diffractogramme de la Figure 2.5(b) où un pic très large est observé.

TABLEAU 2.4 : *Caractéristiques porales et surfaces spécifiques des matériaux obtenus pour des concentrations en soude de 5,0 mM à 27,5 mM. ^a S_{BET} : Surface spécifique accessible Brunauer-Emmet-Teller (BET); ^b V_t : Volume adsorbé total calculé au niveau du dernier point de mesure de la branche d'adsorption; ^c V_m : Volume mésoporeux calculé à une pression relative $P/P_0 \leq 0,75$; ^d D_p : Diamètre des pores obtenu par la méthode de Barret-Joyner-Halenda (BJH) et calculé sur la branche de désorption.*

[NaOH] _i (mM)	S_{BET}^a (m ² /g)	V_t^b (cm ³ /g)	V_m^c (cm ³ /g)	D_p^d (nm)
5,0	1036	2,81	0,91	3,3
7,5	1047	2,26	0,88	3,1
10,0	1132	1,25	1,05	3,1
12,5	1138	1,16	1,05	3,0
14,4	1075	1,13	0,95	2,9
17,5	1129	1,06	0,96	2,9
20,0	1173	1,04	0,96	2,8
22,5	1203	0,97	0,92	2,7
25,0	1378	0,86	0,69	2,6
27,5	1485	0,73	0,64	2,2

Entre 10 mM et 22,5 mM, le Tableau 2.3 indique que le volume mésoporeux reste quasiment constant sur cette gamme et égale à environ 1,00 cm³/g. En dessous de 10 mM et au-dessus de 22,5 mM, le volume mésoporeux est d'environ 0,90 cm³/g. En revanche, le volume poreux total diminue avec la concentration et passe de 2,81 cm³/g à 0,73 cm³/g. Lorsque la concentration augmente de 5 mM à 27,5 mM, la taille des pores D_p diminue et passe de 3,3 nm à 2,2 nm.

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

L'évolution de la surface spécifique S_{BET} corrobore la diminution de taille des pores puisqu'elle augmente progressivement de 1036 m²/g à 1485 m²/g. Pour l'échantillon synthétisé à une concentration de 27,5 mM, la distribution en taille des pores montre que certains pores ont une taille inférieure à 2 nm. La méthode BJH n'étant plus applicable à partir de cette taille, nous nous contenterons simplement de constater ce phénomène.

2.1.2.5 Corrélation entre degré de condensation et taux de contraction du réseau

Afin de savoir si la concentration initiale en soude a une influence sur la manière dont le réseau de silice est condensé, nous avons cherché à déterminer le degré de condensation des différents échantillons avant calcination. Ce dernier peut être obtenu de manière quantitative en utilisant la RMN du solide ²⁹Si en rotation à l'angle magique (*Magic Angle Spinning*, MAS) en simple impulsion. Une nomenclature simple désigne la lettre Q les centres silicium lorsqu'ils sont entourés de quatre oxygènes (ce qui est le cas pour tous les siliciums dans ce système). Un chiffre additionné en exposant donne, lui, le nombre de liaisons Si-O-Si reliant ce centre à d'autres atomes de silicium. La représentation schématique de la Figure 2.8(a) illustre cette notation. Les surfaces des pics désignés par Q⁴ (Si(OSi)₄), Q³ (Si(OSi)₃(OH)), Q² (Si(OSi)₂(OH)₂), Q¹ (Si(OSi)(OH)₃) et Q⁰ (Si(OH)₄) étant proportionnelles au nombre de ces centres, on obtient par les rapports des surfaces des pics, les rapports des populations des différents centres. Le degré de condensation D_{cond} a été défini par Viitala *et al.* [354] par l'équation suivante :

$$D_{\text{cond}} = \left(\frac{Q^4}{Q^2 + Q^3} \right) \quad (2.1)$$

Après calcination à une température de 550 °C, le degré de polymérisation est identique quelles que soient les conditions de synthèse initiales. Le rapport molaire SiOH/Si est égal à 0,3 [346]. Avec la calcination, une polymérisation additionnelle a lieu et dépend du taux de condensation achevé pendant la synthèse. Cette polymérisation engendre une contraction de la distance de corrélation de 3 à 30% qui dépend des conditions de synthèse [30, 152, 355]. Une moindre contraction de la distance de corrélation d signifie une meilleure polymérisation initiale du mur de silice [356]. C'est pourquoi, le taux de contraction du réseau a également été déterminé. Il est défini par l'équation ci-dessous :

$$P_{\text{cont}}(\%) = \left(1 - \frac{d_{\text{calc}}}{d_{\text{synth}}} \right) \times 100 \quad (2.2)$$

où d_{synth} et d_{calc} sont les distances du pic (100) des échantillons avant et après calcination, respectivement.

La quantité de groupements silanols (SiOH) par rapport à la quantité totale de silicium Si peut être aussi déterminée *via* la RMN ²⁹Si MAS. Cette quantité a été définie par Igarashi *et al.* [162] par l'équation suivante :

$$SiOH(mol\% - Si) = \left(\frac{2Q^2 + Q^3}{Q^2 + Q^3 + Q^4} \right) \times 100 \quad (2.3)$$

Sur la Figure 2.8, les spectres RMN ^{29}Si MAS en simple impulsion du ^{29}Si pour les échantillons synthétisés à des concentrations en soude de 5, 10, 14,4, 20 et 25 mM sont donnés. Dans le Tableau 2.5, les distances de corrélation avant et après calcination, les valeurs des Q_s^i , les degrés de condensation D_{cond} , les taux de contraction P_{cont} , les quantités de silanols $SiOH$ et les rendements de synthèse η sont rassemblés pour les différentes concentrations en soude. La Figure 2.8(a) reporte le spectre RMN de l'échantillon obtenu avec 5 mM de soude. Les trois pics caractéristiques des populations Q^2 (~ -90 ppm), Q^3 (~ -99 ppm) et Q^4 (~ -109 ppm) sont présents sur le spectre. Par déconvolution du signal, il est montré que 60%, 35% et 5% des atomes sont reliés par quatre, trois ou deux atomes de Si par le biais des ponts siloxanes (Tableau 2.5).

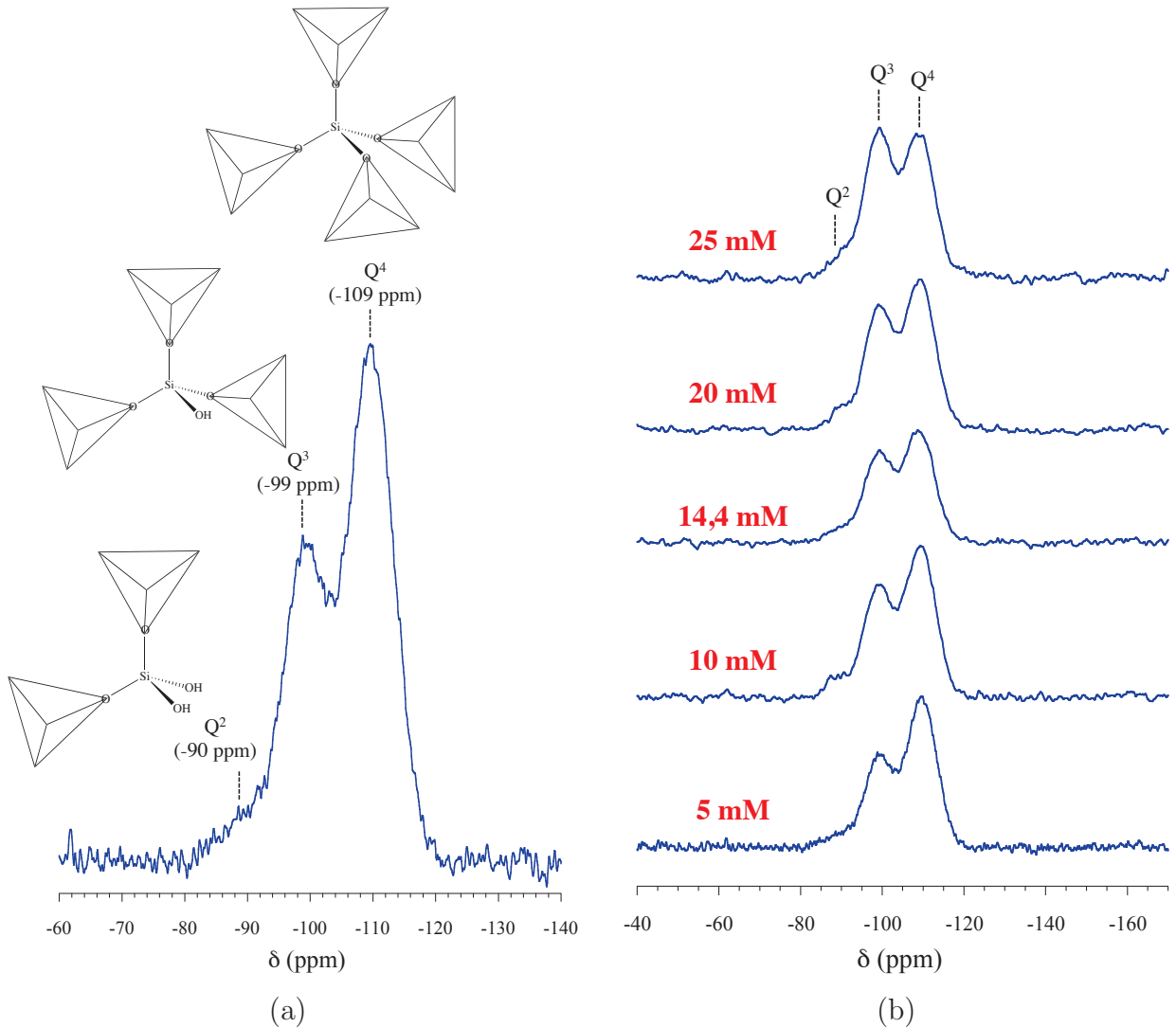


FIGURE 2.8 : Spectres RMN ^{29}Si MAS des poudres non-calcinées et synthétisées pour les concentrations en soude de : (a) 5 mM, (b) 5, 10, 14,4, 20 et 25 mM. Ceux-ci ont été réalisés sur les poudres avant calcination. La majorité des centres de silice est reliée à trois ou quatre autres tétraèdres de silice. Schéma de représentation des Q_s^i inspiré de [79]. Les conditions d'analyse sont données en Annexe E.1.

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

TABEAU 2.5 : Tableau récapitulatif des distances de corrélation avant (d_{synth}) et après calcination (d_{calc}) correspondant au plan (100) et intensités relatives des contributions caractéristiques du silicium. Les surfaces ont été déterminées par déconvolution des différentes contributions. Degré de condensation D_{cond} et taux de contraction P_{cont} (%) du réseau de silice pour des concentrations en soude croissantes et quantité de groupements silanols (SiOH) par rapport à la quantité totale de silicium Si. En rouge, la synthèse « standard ». Erreurs estimées sur Q^2 , Q^3 et Q^4 : 5%. Les décompositions des spectres RMN ont été effectuées avec le logiciel DMfit [357].

[NaOH] _i (mM)	d_{synth} (nm)	d_{calc} (nm)	Q^4 (%)	Q^3 (%)	Q^2 (%)	D_{cond}	P_{cont} (%)	SiOH (mol%-Si)	η^a (%)
5,0	4,22	4,12	60	35	5	1,5	2	45	77
10,0	4,12	4,02	55	40	4	1,2	2	49	83
14,4	4,15	3,85	57	36	7	1,3	6	50	75
20,0	3,99	3,79	55	40	5	1,2	5	50	63
25,0	3,72	3,42	50	42	8	1,0	8	57	58

^a η : Rendement de synthèse calculé en divisant la masse obtenue après calcination (en extrapolant par rapport à la masse obtenue directement après synthèse) par la masse théorique de silice égale à 540 mg.

La Figure 2.8(b) rassemble le spectre RMN des MSNs synthétisées avec des concentrations différentes en soude. Lorsque la concentration en soude augmente, les intensités relatives des pics des populations Q^4 diminuent au profit des intensités relatives des pics des populations Q^3 (Tableau 2.5). Ce résultat est confirmé par la diminution du degré de condensation D_{cond} puisqu'il passe de 1,5 à 1,0 lorsque la concentration en soude augmente de 5 à 25 mM (Tableau 2.5). Ceci est donc une indication de la diminution du degré de polymérisation du mur de silice avec la concentration en soude. Le taux de contraction du réseau P_{cont} , la quantité de silanols relative SiOH et le rendement de synthèse η corroborent aussi cette tendance puisqu'ils diminuent avec la concentration en soude en passant de 2% à 8%, 45% à 57% et 77% à 58%, respectivement (Tableau 2.5). Par rapport à la quantité de silanols généralement trouvée dans la littérature pour la synthèse de matériaux de type MCM-41, le nombre de silanols SiOH obtenu pour ces synthèses est très similaire. Par exemple, Igarashi *et al.* obtient un pourcentage molaire de SiOH de 43% de la quantité molaire de Si total pour un MCM-41 synthétisé à 100 °C en utilisant le C₁₆TAB comme agent structurant, et le TEOS comme source de silice [162].

2.1.2.6 Évolution du rapport molaire SiO₂/CTA⁺

Dans la gamme de concentration en soude étudiée, c'est à dire entre 5 mM et 27,5 mM (pH de 10,7 à 11,6), la vitesse d'hydrolyse du TEOS augmente linéairement tandis que la vitesse de condensation diminue quasiment linéairement [67]. Ceci est d'ailleurs corroboré par une augmentation de la solubilité des silicates avec le pH [34]. Dans toutes nos conditions de pH, la quantité de CTAB ajoutée initialement reste constante. Ainsi, la modification du pH influe directement sur le rapport silicate/CTA⁺, donc sur la balance de charge silicate/CTA⁺.

Ainsi, lorsque le pH est modifié, le rapport silicate/CTA⁺ donc la balance de charge silicate/CTA⁺ est modifiée. Ce rapport est donc un paramètre important afin de comprendre l'évolution des structures lorsque le pH initial de synthèse est modifié. Afin de prendre en compte

ce paramètre et de l'étudier en fonction de la concentration en soude ajoutée initialement, nous avons quantifié le rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ par ATG pour les poudres non calcinées.

Tout d'abord, considérons l'ATG de l'échantillon synthétisé dans les conditions « standards » (Figure 2.9), et analysons les différentes pertes de masse. Le premier pic de perte de masse (**1**) entre 25 °C et 130 °C (températures obtenues grâce à la dérivée) provient de l'eau physisorbée et est responsable de 6,0% de la perte de masse totale. La deuxième perte de masse (**2**) de 37,0% entre 100-150 °C et 450 °C est due à la décomposition du tensioactif cationique par un processus d'élimination d'Hoffman suivi de la désorption de triméthylamine et des produits de décomposition de l'hexadécène selon l'équation suivante :



Ce processus a été confirmé par l'identification d'hexadécène et de triméthylamine par Keene *et al.* [358]. Au-dessus de 450 °C (**3**), l'essentiel de la perte de masse est dû à la perte d'eau par déshydroxylation des groupements SiOH de la surface [154] et contribue à 2,9% de la perte de masse totale. Keene *et al.* [358] ont mis en évidence, que dans le cas des matériaux aux tensioactifs structurants (MTS) siliciques, la décomposition du tensioactif en forte interaction avec la surface pouvait avoir lieu jusqu'à 750 °C. Néanmoins, nous avons déterminé le rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ en considérant que la perte de masse due à la dégradation du tensioactif n'a plus lieu au delà de 450 °C. Pour l'échantillon dont la courbe ATG est présentée, ce rapport est égal à 7,1. Les rapports molaires $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ pour les échantillons synthétisés avec des concentrations en soude croissantes sont indiqués dans le Tableau 2.6.

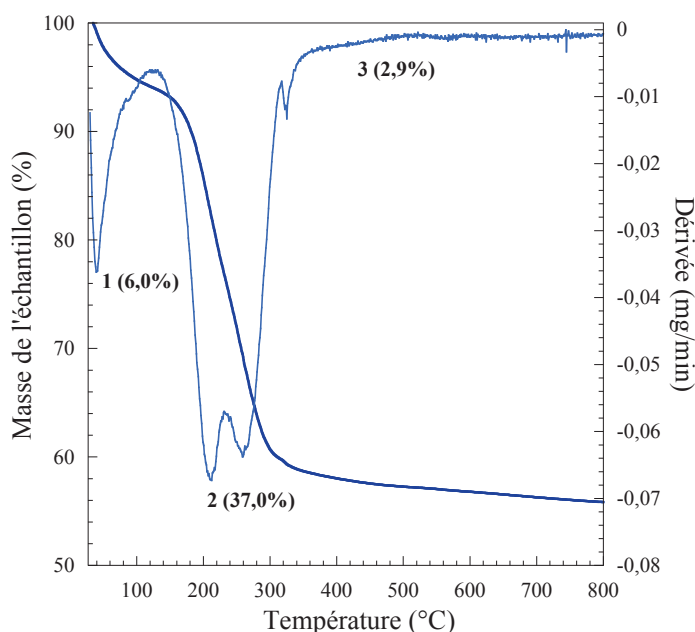


FIGURE 2.9 : Courbe ATG et courbe dérivée de la masse de l'échantillon synthétisé à 14,4 mM. Le traitement thermique est réalisé sous flux d'air à une rampe de température de 5 °C/min de 25 °C à 800 °C. Pour plus d'informations sur l'analyse et les caractéristiques techniques de l'appareil, se reporter à l'Annexe F.

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

TABLEAU 2.6 : Rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ pour les échantillons synthétisés à des concentrations en soude 5, 10, 14,4, 20 et 25 mM.

$[\text{NaOH}]_i$ (mM)	5,0	10,0	14,4	20,0	25,0
$\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ (mol/mol)	10,3	7,0	7,1	6,0	6,1

Lorsque la concentration en soude augmente, le rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ diminue. Pour la synthèse de matériaux de type MCM-41 à température ambiante, Voegtlin *et al.* ont observé la même tendance en fonction du pH de synthèse [64]. Cette évolution peut être corrélée avec les résultats obtenus en RMN ^{29}Si . En effet, lorsque la concentration en soude est de 25 mM, le degré de polycondensation des espèces silicatées est le plus faible, le nombre de SiOH le plus grand, et le rapport $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ le plus petit. Cela indique qu'à ce pH de synthèse, il faut un plus grand nombre de CTA^+ pour compenser le nombre d'espèces silicatées.

2.1.2.7 Discussion

Lorsque la concentration augmente de 5,0 mM à 27,5 mM, trois types de matériaux sont obtenus. Quand la concentration en soude est plus faible que 12,5 mM, des agrégats composés de nanoparticules possédant une structure désordonnée sont obtenus. Entre 12,5 mM et 22,5 mM, des nanoparticules de type MCM-41 possédant un haut degré de mésoporosité texturale sont formées et leur taille augmente drastiquement de 80 à 400 nm. Dans cette gamme de pH, la surface spécifique S_{BET} , le volume poreux V_p et la taille du mur de silice e restent constants tandis que la distance centre à centre a_0 diminue. Lorsque la concentration en soude est supérieure à 25 mM, des nanoparticules super-microporeuses désordonnées d'un diamètre supérieur à 700 nm sont observées. Sur la Figure 2.10, les tailles obtenues par microscopie électronique en transmission et par diffusion de la lumière sont présentées en fonction de la concentration en soude initialement introduite et les trois types de matériaux obtenus sont définis. Sur la gamme de concentration étudiée, il a été démontré que le rapport $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ ainsi que le degré de polymérisation du réseau diminuait.

Dans le chapitre 1, nous avons présenté une proposition de mécanisme établi par Sadisavan *et al.* [107]. Même si la morphologie et la structuration des matériaux dépendent fortement de la concentration en base, le mécanisme que les auteurs ont proposé (pour des conditions beaucoup plus basiques), peut être raisonnablement appliqué à notre système. Pour rappel, nous indiquons une nouvelle fois ce mécanisme qui a lieu en quatre étapes :

- formation de bâtonnets courts constitués de micelles de tensioactif autour desquelles une fine couche de silice-silicates de 1 à 2 nm est présente ;
- agrégation sous la forme de nanoparticules sphériques désordonnées de moins de 50 nm de diamètre ;
- réorganisation interne en phase nématique qui conduit à une particule mono domaine en forme d'ellipse de l'ordre de 60 nm ;
- élongation du système tensioactif-silice.

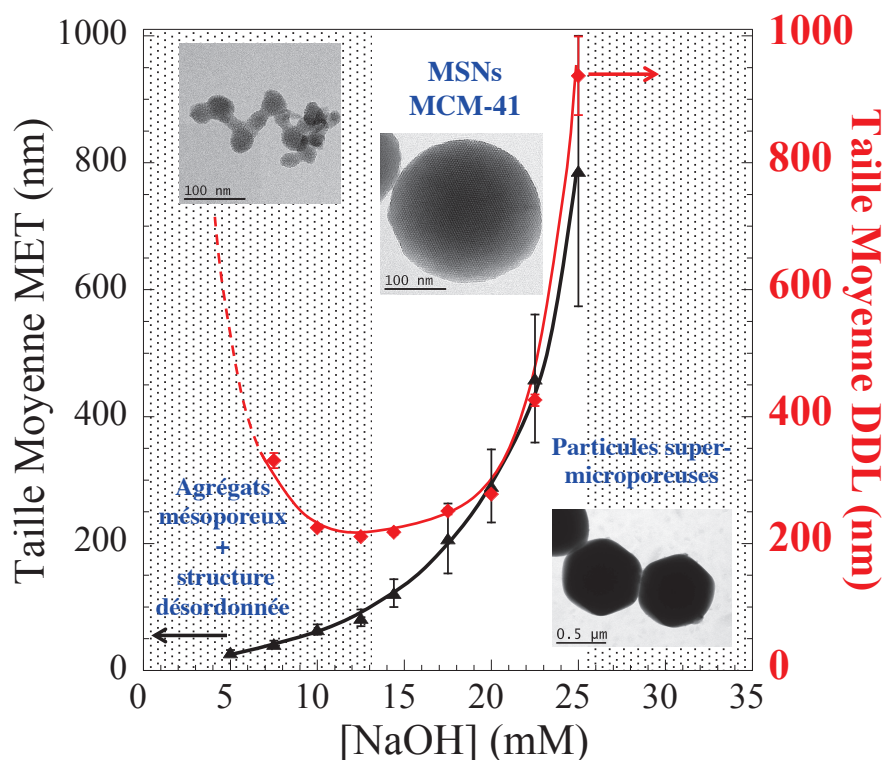


FIGURE 2.10 : Schéma récapitulatif des trois domaines observés lorsque la concentration en NaOH évolue de 5 mM à 27,5 mM.

Dans notre gamme de concentration, le taux d'hydrolyse augmente linéairement et le taux de condensation diminue quasi linéairement [67]. Ceci est corroboré par une augmentation de la solubilité des silicates avec le pH [34]. Dans le même temps, le rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ et le taux de condensation diminuent avec le pH. Ce phénomène ne peut expliquer à lui tout seul l'évolution des structures que nous obtenons avec le pH. La balance de charge $\text{CTA}^+/\text{silicate}$ doit être considérée comme un paramètre pertinent puisque la densité de charge des silicates dépend du pH.

A pH faiblement basique ($\text{pH} = 10,7$ pour la plus basse concentration), le pK_a des espèces siliciques monomériques ($\text{Si}(\text{OH})_4/\text{SiO}(\text{OH})_3^-$) et dimériques ($\text{H}_2\text{Si}_2\text{O}_7/\text{HSi}_2\text{O}_7^-$) valent 9,5 et 10,7, respectivement [205]. Ces espèces moléculaires inorganiques présentes en solution aux premiers instants sont ionisées (94% et 50%, respectivement). Dans ces conditions, la faible solubilité des silicates et leur faible charge ne doivent probablement pas favoriser leur interaction avec la tête cationique de CTAB. De ce fait, ces conditions doivent favoriser la nucléation de particules primaires désordonnées qui se connectent entre elles pour former de larges agrégats. Le taux de condensation étant très élevé, il est fort probable que cela « bloque » ou « fige » le système et limite toute réorganisation interne.

Dans la gamme de concentrations de 12,5 mM à 22,5 mM, le taux de condensation diminue et l'augmentation de la densité de charge des espèces inorganiques permet l'agrégation puis la ré-organisation des particules primaires hybrides en plus grosses particules. Celles-ci sont homogènes et possèdent une structure bi-dimensionnelle organisée par le tensioactif. De plus, le

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

taux d'agrégation des particules primaires hybrides augmentent avec le pH à cause d'une plus grande densité de charge des espèces silicates, ce qui se traduit par une augmentation de la taille avec le pH. Ce comportement est similaire à celui que l'on observe pour les particules de type Stöber [359–361].

A partir d'une concentration de soude de 25 mM (pH \sim 11,6), la taille des particules augmente parce que le nombre de cations pour compenser l'augmentation de la densité de charge des silicates augmente. De plus, à cause du faible taux de polycondensation des silicates, il est très probable que le rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ soit trop faible pour permettre une complète ré-organisation des micelles en réseau hexagonal 2D. Il n'y a plus de structure de type MCM-41 car la condensation est trop rapide, ce qui conduit à des phases lamellaires [72] ou à des matériaux caractérisés par une faible épaisseur de mur et une très grande contraction durant la calcination [65, 362].

2.1.3 Influence de la température de synthèse

Dans la plupart des études, la température de réaction affecte la taille et la structure des particules car la thermodynamique des transitions de phases cristal-liquides des tensioactifs et les cinétiques d'hydrolyse du TEOS suivie de la condensation dépendent fortement de la température [34, 363, 364]. Afin d'étudier l'effet de la température sur la taille et la structure interne des MSNs, les particules ont été synthétisées à des températures de 50 °C, 70 °C et 90 °C avec la composition dite « standard » et en utilisant les mêmes conditions opératoires. Les propriétés morphologiques, texturales et structurales sont présentées dans le Tableau 2.7. On présente aussi les diffractogrammes après calcination des trois synthèses sur la Figure 2.11.

TABLEAU 2.7 : *Propriétés morphologiques, structurales et texturales des MSNs synthétisées à différentes températures pour une vitesse d'agitation de 700 rpm et des rapports molaires constants égales à 0,32NaOH/1TEOS/0,127CTAB/1235H₂O.*

Temperature (°C)	d _{DDL} (nm)	PDI	d _{MET} (nm)	c _v	a ₀ ^a (nm)	e ^b (nm)	S _{BET} (m ² /g)	V _m (cm ³ /g)	D _p (nm)
50	240	0,16	118	0,19	4,48	1,8	1089	0,91	2,7
70	218	0,11	122	0,18	4,43	1,6	1075	0,95	2,9
90	240	0,18	129	0,21	4,55	1,6	1118	1,05	2,8

^aa₀ = 2d₁₀₀/√3 où d₁₀₀ est la distance de corrélation correspondant au plan (100) d'un réseau tridimensionnel hexagonal; ^be : épaisseur du mur de silice égale a₀ - D_p.

Avec la température, la taille des particules d_{MET}, le coefficient de variation c_v, le diamètre hydrodynamique d_{DDL} et l'indice de polydispersité PDI n'évoluent pas significativement. Pour toutes les températures, les diffractogrammes de la Figure 2.11 montrent quatre pics bien définis à l'exception de celui correspondant à l'échantillon synthétisé à 90 °C où un élargissement des pics (100), (110) et (200) est observé. Cela suggère une diminution de la qualité de l'arrangement hexagonal, ce qui est confirmé par le cliché MET de la Figure 2.11(b). Avec la température, le paramètre de maille a₀ ne varie quasiment pas non plus et est égale à 4,5 nm. Les isothermes

d'adsorption-désorption (non-montrées) sont toutes de type IV et présentent la condensation capillaire caractéristique des mésoporeux à P/P_0 environ 0,3. La surface spécifique S_{BET} , la taille des pores D_p et le volume poreux V_p n'évoluent pas avec la température.

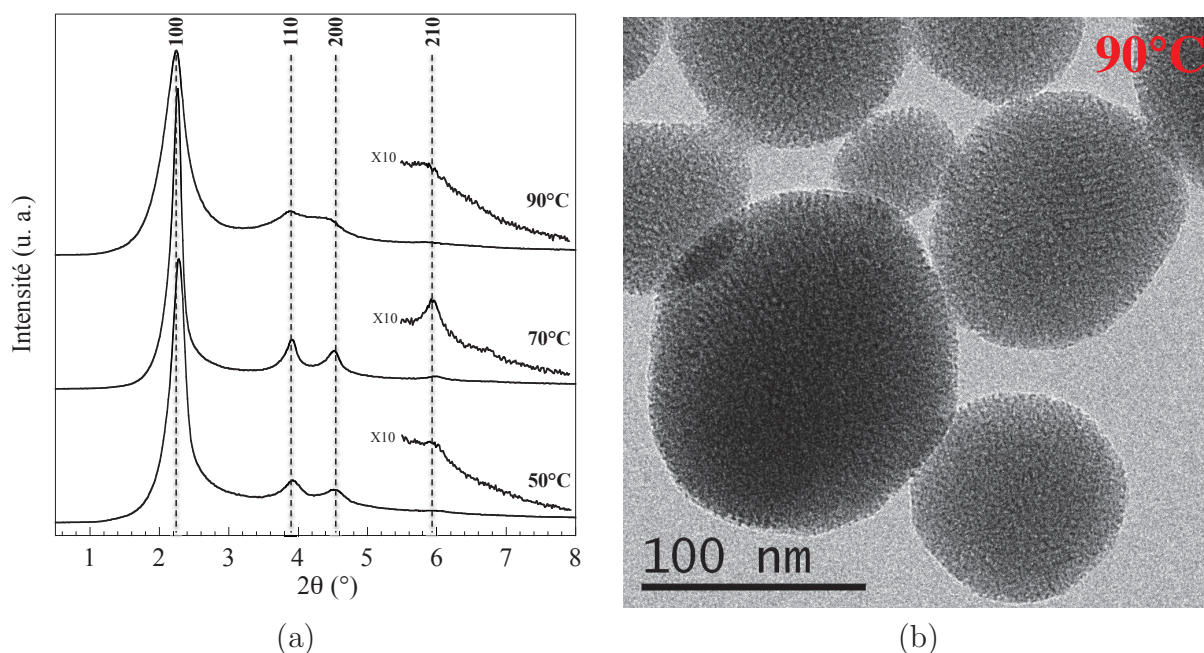


FIGURE 2.11 : (a) Diagramme de diffraction des échantillons synthétisés pour des températures de synthèse de 50 °C, 70 °C et 90 °C, (b) Image MET de l'échantillon synthétisé à une température de 90 °C.

En conclusion, la morphologie et la taille des MSNs ne sont pas affectées par la température entre 50 °C et 90 °C. Malgré tout, un petit effet apparaît sur l'organisation interne des pores à 90 °C avec une perte partielle de la structure MCM-41.

2.1.4 Influence de la vitesse d'agitation

L'un des paramètres important dans la synthèse des colloïdes est la vitesse d'agitation. Celle-ci permet une bonne homogénéisation et favorise les interactions entre les silicates et les têtes polaires cationiques du tensioactif. Dans la littérature, plusieurs auteurs reportent l'importance de la vitesse d'agitation sur la synthèse de matériaux mésostructurés [123, 365]. Par exemple, Kim *et al.* ont prouvé que dans leur condition de synthèse, une transformation d'une structure ordonnée hexagonale 2D ($P6mm$) à une structure ordonnée 3D cubique ($Ia\bar{3}d$) avait lieu lorsque la vitesse d'agitation passait de 650 rpm à 850 rpm. Ainsi, il nous a paru intéressant d'évaluer l'influence que pouvait avoir la vitesse d'agitation sur la morphologie, la taille et les propriétés structurales/texturales des MSNs. Pour ce faire, plusieurs vitesses d'agitation ont été testées, à savoir, 150, 400, 550, 700 et 900 rpm tandis que la concentration en soude et la température ont été fixées à 14,4 mM et 70 °C, respectivement.

Les propriétés morphologiques, structurales et texturales des échantillons synthétisés à différentes vitesses d'agitation sont présentées dans le Tableau 2.8. Les clichés de microscopie des

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

échantillons synthétisés à 150 et 400 rpm sont présentés sur la Figure 2.12. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 2.12, la vitesse d'agitation influence fortement la taille et la morphologie des particules. Au dessus de 400 rpm, des particules sphériques sont obtenues. Si la vitesse d'agitation passe de 400 à 900 rpm, la taille moyenne des particules d_{MET} et le coefficient de variation c_v , diminuent progressivement de 163 à 125 nm, et de 0,47 à 0,16, respectivement. A la plus basse vitesse d'agitation (150 rpm), des particules avec une morphologie sphérique et de forme coudée (« *bean-like* ») sont formées avec des tailles variant de 100 nm à 500 nm. La dispersion en taille et en forme induit des valeurs de tailles d_{MET} et des coefficients de variation c_v relativement élevés. Les observations MET corroborent les tailles obtenues en diffusion de la lumière (Tableau 2.8). En effet, au dessus de 400 rpm, les diamètres d_{DDL} et les PDIs diminuent avec la vitesse d'agitation. A 150 rpm, le volume hydrodynamique d_{DDL} et le PDI sont égaux à 418 nm et 0,35, respectivement.

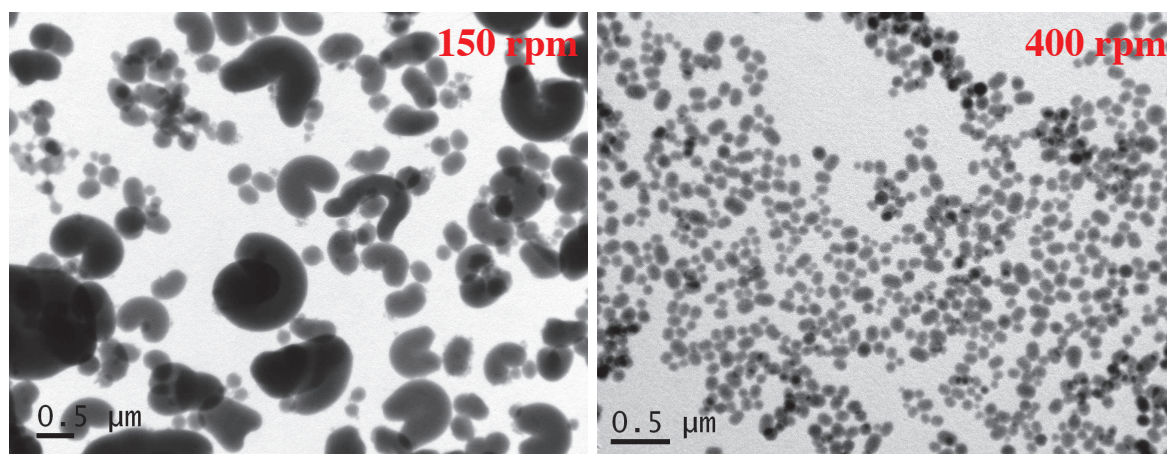


FIGURE 2.12 : Images MET des échantillons synthétisés à 150 et 400 rpm.

TABEAU 2.8 : Propriétés morphologiques, structurales et texturales des MSNs synthétisées à différentes vitesses d'agitation pour une température et des rapports molaires constants : 70 °C et 0,32NaOH/1TEOS/0,127CTAB/1235H₂O, respectivement.

Vitesse d'agitation (rpm)	d_{DDL} (nm)	PDI	d_{MET} (nm)	c_v	a_0 (nm)	e (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_m (cm ³ /g)	D_p (nm)
150	418	0,35	614	0,47	3,72	1,4	1147	0,72	2,3
400	250	0,16	163	0,22	4,36	1,6	1070	1,00	2,8
550	277	0,18	137	0,19	4,33	1,5	1121	1,08	2,8
700	218	0,11	122	0,18	4,43	1,6	1075	0,95	2,9
900	202	0,11	125	0,16	4,23	1,4	1075	0,99	2,9

La Figure 2.13 présente les diffractogrammes des échantillons calcinés (à 550 °C pendant 8 heures sous flux d'air) et synthétisés à des vitesses d'agitation de 150, 400, 550, 700 et 900 rpm. Pour des vitesses d'agitation de 400, 550, 700 et 900 rpm, les diagrammes de diffraction sont typiques des matériaux ordonnés de type MCM-41. Pour des vitesses d'agitation de 400, 550 et 700 rpm, les positions des pics (100), (110), (200) et (210) ne changent pas et sont centrées à 2,3 - 4,0 - 4,6 et 6,1 °, respectivement. A ces vitesses d'agitation, le paramètre de maille est

constant et est égal à environ 4,4 nm. A une vitesse d'agitation de 900 rpm, un léger décalage de la position des pics (100), (110), (200) et (210) vers des angles 2θ plus grand a lieu, ce qui induit une légère diminution de la distance centre à centre a_0 . A 150 rpm, la Figure 2.13 montre un diffractogramme différent. Un pic asymétrique est localisé à $2\theta = 2,8^\circ$ suivi d'un pic large à $2\theta = 4,6^\circ$. Le pic asymétrique peut être décrit comme la superposition de deux pics centré à $2\theta = 2,5^\circ$ et $2\theta = 2,8^\circ$. Le diffractogramme suggère donc que les particules comportent deux structures. Les pics à $2\theta_1 = 2,8^\circ$ et $2\theta_2 = 4,6^\circ$ sont typiques d'une structure 2D hexagonale ($d_1 = 3,2$ nm and $d_2 = 1,9$ nm avec $d_1/d_2 \neq \sqrt{3}$ (voir Annexe B)). Le paramètre de maille est légèrement différent, ce qui peut être expliqué par une contraction de la structure poreuse. Le pic localisé à $2\theta = 2,5^\circ$ suggère quant à lui, une structure plutôt vermiculaire.

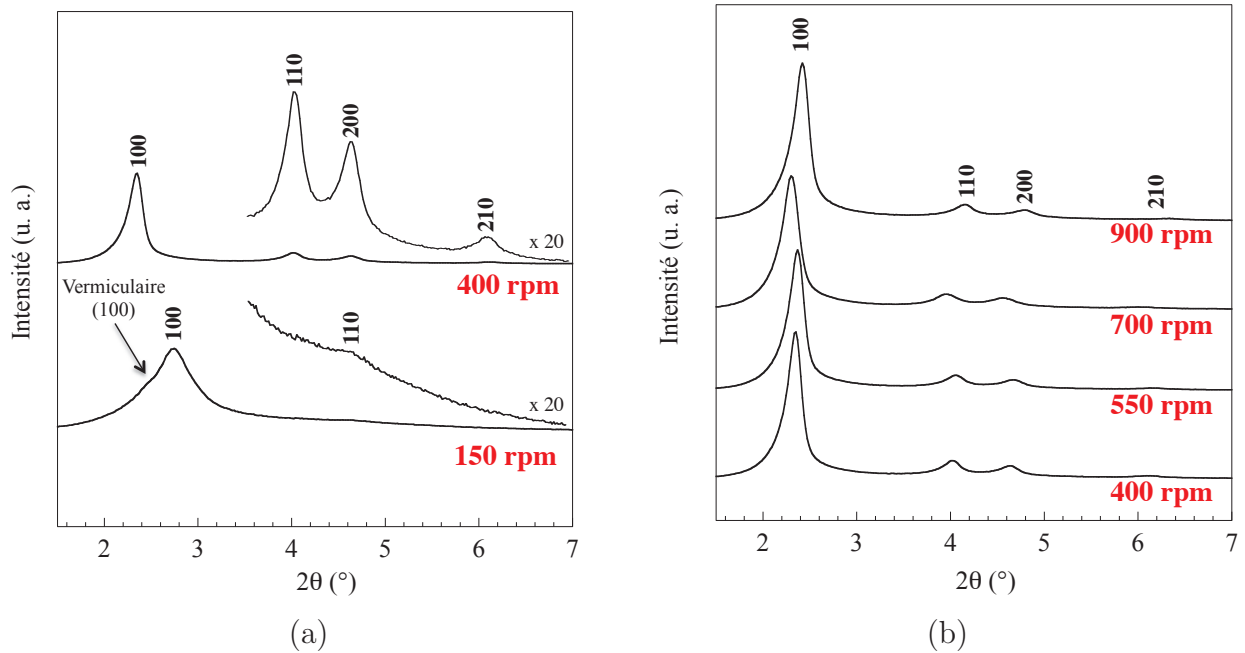


FIGURE 2.13 : Diagrammes de diffraction des échantillons calcinés et synthétisés pour des vitesses d'agitation de 150, 400, 550, 700 et 900 rpm.

La Figure 2.14 présente les clichés de microscopie des différentes « populations » observées pour l'échantillon synthétisé à 150 rpm. Que ce soit au niveau des particules sphériques ou des particules coudées, les clichés de microscopie confirment la présence de la structure vermiculaire et de la structure hexagonale 2D. En effet, les particules sphériques ont des pores arrangés soit de manière hexagonale, soit de manière vermiculaire (Figure 2.14(a-c)). Les particules de forme coudée présentent soit des pores alignés radialement du centre vers l'extérieur de la particule (Figure 2.14(d)) (flèche blanche), soit des pores alignés parallèlement (Figure 2.14(b)). Même si la mesure est approximative et qu'il est clair que cela demande un travail plus approfondi, nous avons essayé de connaître la distance centre à centre à partir des clichés MET de la Figure 2.14(b). En réalisant plusieurs comptages sur un nombre de canaux importants, nous obtenons une distance centre à centre d'environ 3,8 nm et cette valeur est proche de celle trouvée en DRX (3,72 nm, Tableau 2.8) pour la structure hexagonale.

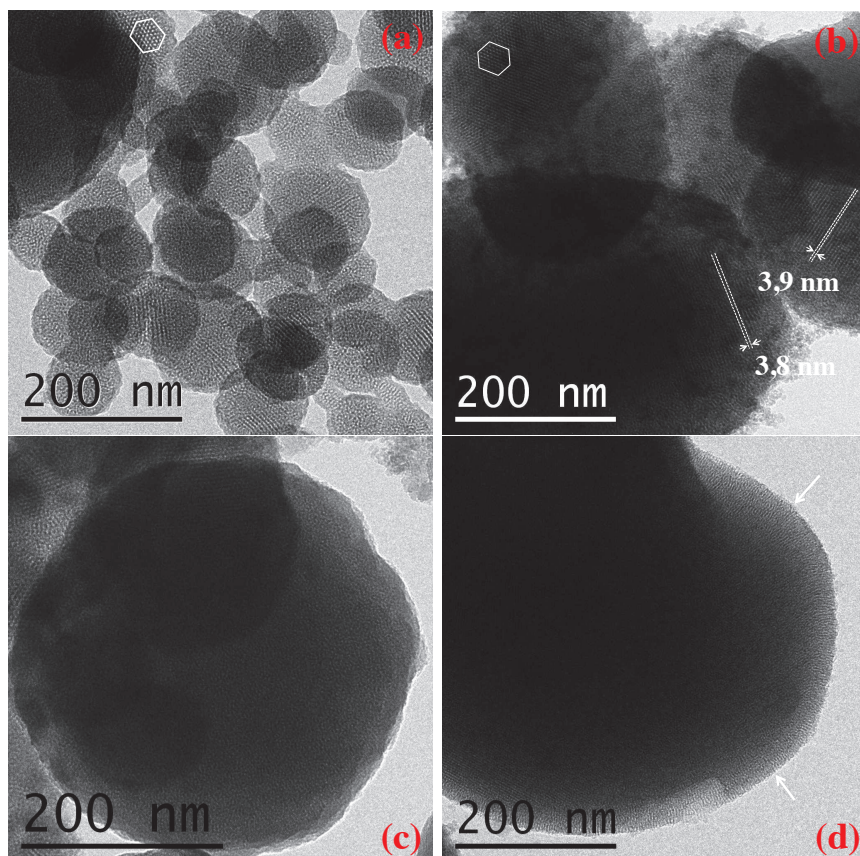


FIGURE 2.14 : Images MET des différentes « populations » observées pour l'échantillon correspondant à une vitesse d'agitation de 150 rpm. Les particules sont soit sphériques, avec des diamètres très différents, ou soit de forme coudée (« bean-like »).

Les propriétés texturales sont aussi notablement affectées par la vitesse d'agitation (Tableau 2.8). Pour les vitesses d'agitation de 400, 550, 700 et 900, des isothermes typiques réversibles de type IV sont observées (non-montrées) et le diamètre des pores D_p , le volume poreux V_p et la surface spécifique S_{BET} n'évoluent pas. A 150 rpm, la présence de micropores associés aux mésopores est clairement identifiée par une augmentation du volume adsorbé à des pressions relatives $P/P_0 < 0,2$ et par une diminution de la taille des pores et du volume poreux (Figure 2.15).

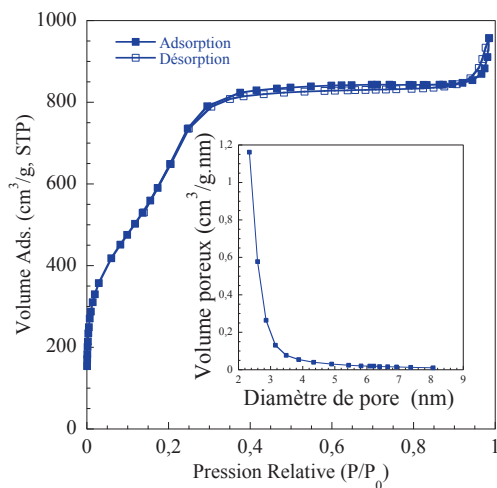


FIGURE 2.15 : Isotherme de sorption de N_2 et distribution de taille des pores pour l'échantillon synthétisé à une vitesse d'agitation de 150 rpm.

Tous ces résultats montrent clairement qu'il existe une valeur seuil à partir de laquelle des nanoparticules sphériques peuvent être formées avec une organisation hexagonale 2D des pores. Si la vitesse d'agitation est trop faible, le taux de collision entre les espèces organiques et inorganiques n'est pas assez important pour permettre une homogénéité de la suspension. En effet, le temps qu'il faut au système silicate/CTA⁺ pour précipiter dépend de la vitesse d'agitation et passe de deux minutes à une heure lorsque la vitesse d'agitation diminue de 400 à 150 rpm. L'inhomogénéité résultante induit différents processus de nucléation/croissance, ce qui génère des particules de différentes tailles, différentes formes et différentes structures.

2.1.5 Influence du mode d'extraction de l'agent tensioactif

2.1.5.1 Etude bibliographique sur les méthodes de libération de la porosité

Pour des applications biomédicales, l'extraction du tensioactif, le CTAB, est une priorité car si elle est totale, elle permet de maximiser le volume poreux disponible pour l'agent anticancéreux et évite les effets cytotoxiques du CTAB. En effet, il est démontré dans la section 2.3.6 que le CTAB est un agent porogène extrêmement toxique vis-à-vis des cellules, et qu'il est indispensable de l'extraire dans sa totalité.

La manière dont est réalisée cette ultime et délicate étape dépend du type d'interaction entre la phase organique et inorganique, et de l'application dont le support fait l'objet. Différentes méthodes existent, et certaines induisent un changement drastique des propriétés physico-chimiques du matériau. Ces changements interviennent au niveau de la structure même du réseau de silice et en fonction de la méthode, la quantité de silanols de surface et le degré de condensation du matériau seront différents.

Dans le cas des matériaux de type MCM-41, la calcination sous air à 550 °C reste la méthode la plus utilisée du fait de son efficacité, de sa simplicité et de son faible coût. Cependant, la calcination modifie grandement les propriétés physico-chimiques du matériau. Elle provoque une diminution du paramètre de maille comprise entre 3 et 30%, augmente l'hydrophobicité de surface du matériau [346, 366, 367], et du fait de son caractère exothermique, contribue à augmenter les défauts de la phase inorganique [368–370]. De plus, la calcination ne permet pas l'introduction de fonctions organiques par co-condensation puisqu'elle détruit dans le même temps les fonctions introduites (voir section 1.3.3). Pour des applications biomédicales, la calcination n'est pas recommandée puisqu'elle génère la formation de très gros agrégats difficilement redispersable en solution. C'est pour cette raison que d'autres méthodes ont été développées, comme par exemple l'irradiation aux micro-ondes [367, 371], la dialyse [127], les ultrasons [372], la calcination en phase liquide [373, 374] ou encore les extractions au solvant incluant le Soxhlet [375], les mélanges NaCl/MetOH [376], HCl/EtOH/NH₄NO₃ [377], HCl/MEtOH [295] ou NH₄NO₃/EtOH [378].

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

2.1.5.2 Démarche expérimentale

Le but de cette étude est de comparer plusieurs méthodes d'extraction afin de trouver celle qui permet une extraction totale du tensioactif. Dans cette étude, il convient aussi de mettre au point une méthode simple et efficace détectant de manière sensible, les traces restantes de CTAB. Pour ce faire, plusieurs synthèses sont réalisées en utilisant les conditions expérimentales « standards » ($[\text{NaOH}]_i = 14,4 \text{ mM}$, température = 70°C et vitesse d'agitation = 700 rpm). Après les lavages à l'éthanol (voir paragraphe 2.1.1.2), les échantillons issus de ces synthèses sont mélangés. La moyenne des tailles obtenues par DDL après synthèse est égale à $(241 \pm 4) \text{ nm}$ avec un PDI de $(0,16 \pm 0,02)$. Par la suite, cet échantillon sera nommé $\text{MSN}_{\text{apsynth}}$. Les méthodes utilisées pour extraire le tensioactif sont les suivantes :

méthode 1 : dégradation thermique (calcination) à 550°C pendant 8h (rampe de $1^\circ\text{C}/\text{min}$) sous un débit d'air de $0,5 \text{ L}/\text{min}$ (MSN_{calc}).

méthode 2 : extraction par Soxhlet à l'éthanol pendant 72 heures ($\text{MSN}_{\text{sox72h}}$).

méthode 3 : extraction en utilisant un mélange d'HCl à $\sim 36\%$ et d'éthanol (120 mL) à reflux pendant 24 heures (inversion de la charge de la silice). Ce procédé est réalisé soit une fois ($\text{MSN}_{\text{HCl}*1}$), soit trois fois ($\text{MSN}_{\text{HCl}*3}$).

méthode 4 : extraction combinée en utilisant tout d'abord un mélange d'HCl à $\sim 36\%$ (10 mL) et d'éthanol (100 mL) (échange d'ions) puis en utilisant un mélange de nitrate d'ammonium NH_4NO_3 (2 g) et d'éthanol (100 mL) à reflux pendant 1 heure. Ce procédé est réalisé soit une fois ($\text{MSN}_{\text{NH}_4^+*1}$), soit quatre fois ($\text{MSN}_{\text{NH}_4^+*4}$).

méthode 5 : extraction combinée à l'HCl/EtOH (10 mL/100 mL) à reflux pendant 1 heure puis extraction à l' NH_4NO_3 /EtOH (2g/100 mL) à reflux pendant 1 heure ($\text{MSN}_{\text{NH}_4^+-\text{HCl}}$).

En plus des techniques de caractérisation utilisées précédemment (DRX, sorption de N_2 , ATG), la spectroscopie Raman est utilisée afin de quantifier et détecter de manière sensible les traces restantes de CTAB. Pour ce faire, l'intensité d'une bande caractéristique du CTAB est mesurée (celle à 2850 cm^{-1}) puis normalisée par rapport à une bande caractéristique de la silice (celle à 486 cm^{-1}). Avant de présenter les résultats obtenus pour les différentes extractions, la méthode de détection que nous avons développé est présentée dans la partie suivante.

2.1.5.3 Détermination du pourcentage de CTAB restant par spectroscopie Raman

La Figure 2.16 présente les spectres Raman du tensioactif sous sa forme cristalline ($\text{CTAB}_{(\text{s})}$), des particules avant extraction et des particules extraites quatre fois au nitrate d'ammonium entre $400\text{-}1550 \text{ cm}^{-1}$ et $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$. On présente aussi les spectres Raman de la silice dans le domaine $400\text{-}1550 \text{ cm}^{-1}$ et celui du TEOS entre $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$. Dans la suite, nous parlerons dans certains cas du CTAB même si lorsqu'il est présent dans la matrice de silice, il est sous forme CTA^+ .

Pour des raisons de clarté évidente, nous nous contenterons de décrire les bandes les plus intenses et de commenter en lien avec la littérature, les différences que l'on observe lorsque le

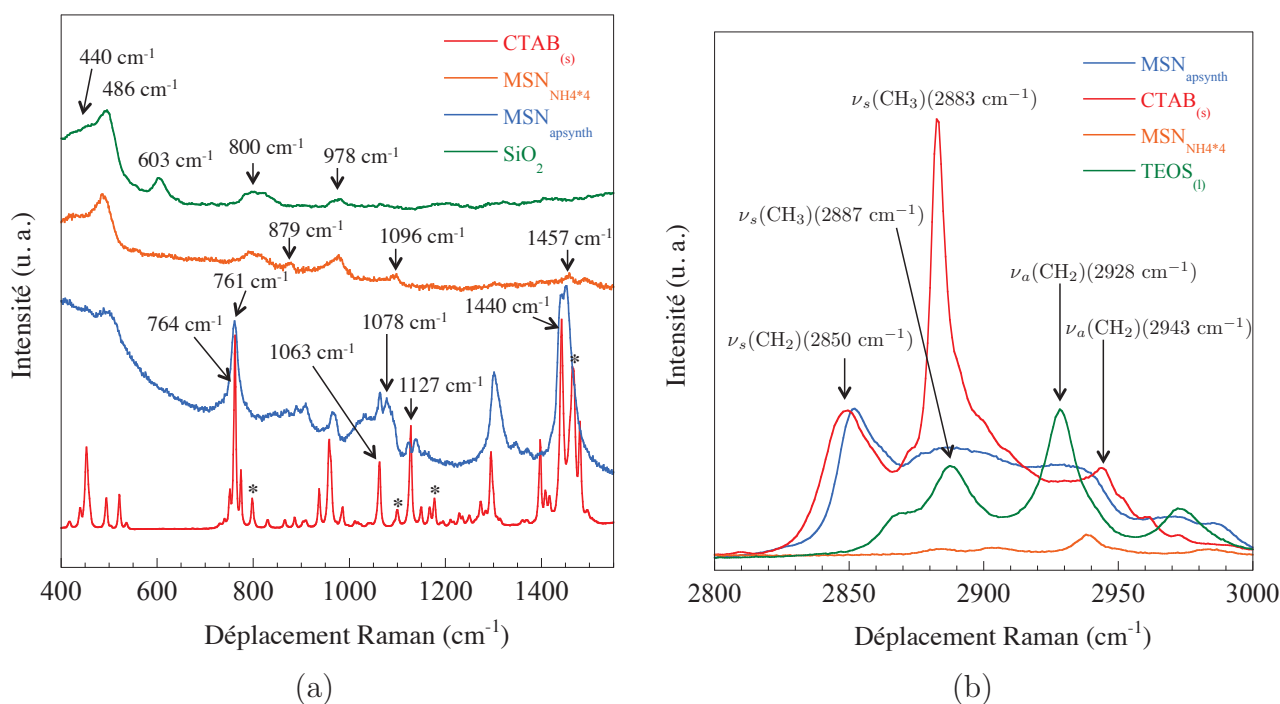


FIGURE 2.16 : (a) Spectres Raman entre 400 cm⁻¹ et 1550 cm⁻¹ du CTAB_(s), des MSNs extraites quatre fois avec NH₄⁺, des MSNs avant extraction et des NPs Stöber calcinées (référence silice) pendant 4 heures à 550°C sous un débit d'air de 0,5 L/min. (b) Spectres Raman entre 2800 cm⁻¹ et 3000 cm⁻¹ des MSNs avant extraction, du CTAB_(s), des MSNs extraites quatre fois avec NH₄⁺ et du TEOS_(l). Les mesures sont effectuées à 25°C et prises avec un laser de longueur d'onde d'excitation de 785 nm à l'exception des mesures du spectre des NPs Stöber calcinées prises avec un laser de longueur d'onde d'excitation de 532 nm. Plus d'informations sur l'appareillage utilisé sont disponibles en Annexe F.

CTAB est sous sa forme cristalline ou sous sa forme « encapsulée ». En effet, les spectres Raman du CTAB sous différentes formes ont abondamment été étudiés [379, 380]. Les bandes intenses à 1063 cm⁻¹ et 1127 cm⁻¹ correspondent aux modes de vibration d'élongation symétrique et asymétrique C-C, respectivement. Ces deux bandes sont caractéristiques des vibrations de la chaîne hydrocarbonée adoptant une conformation trans-trans (zig-zag) dans laquelle un carbone sur deux bouge en direction opposée. Le pic très intense à 764 cm⁻¹ est attribué à la vibration de déformation asymétrique hors du plan (rocking) des groupements méthyles de la tête polaire, N(CH₃)₃⁺. Un autre pic très intense apparaît à 1440 cm⁻¹ et correspond à la vibration d'élongation des CH₂ de la chaîne hydrocarbonée. À 1100 et 1176 cm⁻¹, deux bandes caractéristiques des vibrations du CTAB sous sa forme cristalline sont aussi présentes. Elles correspondent respectivement à la vibration d'élongation des liaisons C-C et de déformation symétrique hors du plan (wagging) des CH₂ de la chaîne carbonée. Une autre bande caractéristique du CTAB sous sa forme cristalline est celle à 1465 cm⁻¹ et représente la vibration d'élongation des CH₂ de la chaîne hydrocarbonée. Entre 2800 et 3000 cm⁻¹, les pics à ~2850 (~2880) et ~2940 (~2970) cm⁻¹ correspondent aux vibrations d'élongation symétrique et asymétrique des liaisons C-H des groupements CH₂ (CH₃), respectivement.

Par comparaison avec le CTAB_(s) qui adopte une conformation trans-trans (zig-zag) sous forme cristalline, le CTAB « encapsulé » montre un comportement très similaire à celui qu'adopte

le CTAB en solution aqueuse [380]. Par exemple, une bande apparaît à 1078 cm^{-1} et correspond au mode d'élongation des liaisons C-C de la chaîne hydrocarbonée en conformation trans-gauche (hélicoïdale). Les molécules de CTAB sous forme de micelles sphériques ou cylindriques en solution aqueuse seraient responsables d'une telle bande [379]. De plus, de nombreuses bandes caractéristiques de la conformation trans-trans du CTAB_(s) disparaissent lorsque celui-ci est « encapsulé ». C'est le cas des pics à 1100 , 1176 et 1465 cm^{-1} (marqués par des étoiles sur le graphe). Le rapport d'intensité I_{2850}/I_{2890} est aussi beaucoup plus grand lorsque le CTAB est confiné dans la silice, ce qui peut être expliqué par la présence d'interactions entre la tête cationique du CTAB et les silicates. Cette hypothèse est confirmée par le fait que le pic caractéristique des vibrations de déformation des groupements méthyles de la tête polaire, $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ se décale légèrement de 764 à 761 cm^{-1} et celui à 797 cm^{-1} (vibration d'élongation asymétrique dans le plan des CH_3 de la tête polaire) disparaît complètement.

Le spectre de référence de la silice (NPs Stöber calcinées) est donné sur la Figure 2.16. La bande retrouvée à 440 cm^{-1} correspond à la vibration de déformation des liaisons siloxanes Si-O-Si (plutôt représentative du cœur du matériau) [159]. Les bandes à 486 cm^{-1} et 603 cm^{-1} , appelées dans la littérature D_1 et D_2 sont des « bandes de défaut » [157, 158]. Elles dénotent la présence d'anneaux de tétraèdres de SiO_4^- à la surface du solide. La bande D_2 correspond à un anneau de trois tétraèdres SiO_4^- , tandis que la bande D_1 correspond à un anneau de quatre tétraèdres SiO_4^- . Ces structures sont formées par déshydroxylation de deux groupements silanols vicinaux [160]. Le pic à 800 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation symétrique des liaisons Si-O à l'intérieur du tétraèdre SiO_4^- . Pour finir, on retrouve la vibration d'élongation à 978 cm^{-1} caractéristique des groupements Si-OH [159].

Les spectres de la silice et des particules avant ou après extraction présentent une bande de vibration à 486 cm^{-1} (bande D_1). Après extraction, on retrouve aussi les pics à 800 et 978 cm^{-1} ($\nu_s(\text{Si-O})$ et $\nu_s(\text{Si-OH})$). Le pic à 603 cm^{-1} (D_2) est par contre absent du spectre. Ceci est expliqué par le traitement thermique que les NPs de Stöber ont subi. En effet, la formation des anneaux à trois ou à quatre tétraèdres SiO_4^- est une déshydroxylation de surface qui dépend de la température. A basse température, ce sont les anneaux à quatre tétraèdres qui se forment car ils possèdent une énergie d'activation moins grande [157, 158]. Il faudrait augmenter beaucoup plus la température pour faire apparaître la bande D_2 . On remarque d'ailleurs que l'intensité de la bande à 978 cm^{-1} est un bon marqueur des traitements thermiques subis par le matériau car la quantité de silanols présents dans le matériau va diminuer avec la température par déshydroxylation. Par rapport au spectre de la silice Stöber, le spectre des particules mésoporeuses après extraction ($\text{MSN}_{\text{NH}_4^+*4}$) montre trois pics supplémentaires à 879 , 1096 et 1457 cm^{-1} . Le premier pic à 879 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation asymétrique des liaisons C-C et C-O de l'éthanol. Le deuxième pic peut être attribué à deux vibrations : la vibration d'élongation asymétrique des liaisons C-C-O de l'éthanol ou la vibration d'élongation symétrique des liaisons Si-O-C provenant des groupements éthoxys du TEOS. La dernière bande à 1457 cm^{-1} peut être corrélée à la vibration de déformation des liaisons H-C-H présentes dans

l'éthanol et dans le TEOS [381]. Ainsi, il est probable qu'il reste à l'intérieur des pores quelques traces du solvant. Dans la mesure où les bandes de vibrations d'élongation des groupements CH_2 et CH_3 caractéristiques du TEOS sont observées sur le spectre des MSNs avant et après extraction (Figure 2.16), on peut en déduire qu'une partie du réseau silicique est composé par du TEOS partiellement hydrolysé [382].

Afin de quantifier la quantité de CTAB restant à l'intérieur des pores, il convient de choisir des pics caractéristiques de la silice et du CTAB qui ne changent pas de position avec le type d'extraction et qui sont relativement isolés. Au regard des spectres présentés dans ce paragraphe, les pics à 486 cm^{-1} pour la silice et à 2850 cm^{-1} pour le CTAB sont les plus appropriés.

2.1.5.4 Propriétés physico-chimiques des MSNs après extraction

Les propriétés physico-chimiques des MSNs obtenues après différents types d'extraction sont reportées dans le Tableau 2.9. Avant extraction, le diffractogramme (non-présenté) montre l'existence des quatre pics de corrélations attribuables à la maille hexagonale bidimensionnelle caractéristique des matériaux de type MCM-41. Le rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ est très proche de celui trouvé précédemment et est égale à 7,0. **Après calcination**, l'arrangement hexagonal est conservé et une contraction de 4% du réseau est observée. L'isotherme de sorption de N_2 de l'échantillon calciné montre une marche de condensation capillaire abrupte à $P/P_0 \sim 0,3$. La surface spécifique S_{BET} , le volume poreux V_m et la taille des pores D_p sont égaux à $1136\text{ m}^2/\text{g}$, $1,05\text{ cm}^3/\text{g}$ et $2,9\text{ nm}$, respectivement.

TABLEAU 2.9 : Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des MSNs obtenues après différents modes d'extraction. Les intensités sont obtenues après avoir réalisé un fit linéaire afin de s'affranchir du bruit de fond.

Cond. exp.	d^a (nm)	S_{BET} (m^2/g)	V_m (cm^3/g)	D_p (nm)	$\text{CTA}^+_{\text{ATG}}^b$ (%)	$\text{CTA}^+_{\text{Raman}}^c$ (%)
$\text{MSN}_{\text{apsynth}}$	4,06	196	0,09	3,0	100	100
MSN_{calc}	3,91	1136	1,05	2,9	-	-
$\text{MSN}_{\text{sox72h}}$	4,06	660	0,33	2,8	42	45
$\text{MSN}_{\text{HCl}*1}$	3,94	936	0,79	3,0	17	13
$\text{MSN}_{\text{HCl}*3}$	3,95	1173	1,13	3,0	4	0
$\text{MSN}_{\text{NH}_4^+*1}$	3,88	817	0,56	2,7	20	19
$\text{MSN}_{\text{NH}_4^+*4}$	3,91	1080	1,01	3,1	4	0
$\text{MSN}_{\text{NH}_4^+-\text{HCl}}$	3,99	1124	1,08	3,0	4	1

^a d : distance de corrélation correspondant au plan (100) déterminée après traitement ; ^b $\text{CTA}^+_{\text{ATG}}$: pourcentage de CTA^+ restant déterminé d'après la perte de masse ATG entre 140°C et 400°C ; ^c $\text{CTA}^+_{\text{Raman}}$: pourcentage de CTA^+ restant d'après l'intensité de la bande caractéristique du CTA^+ à 2850 cm^{-1} et normalisée par rapport à la bande de la silice à 486 cm^{-1} .

Après extraction, les diffractogrammes de tous les échantillons présentent quatre pics caractéristiques de la maille hexagonale bidimensionnelle et une isotherme de type IV avec une marche de condensation capillaire à P/P_0 environ 0,3. Quelle que soit la méthode utilisée, la

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

distance de corrélation d est très peu altérée par les traitements mais reste inférieure à celle déterminée avant extraction. Lorsqu'un montage Soxhlet (**méthode 2**) est utilisé pendant 72 heures, une partie seulement du CTA^+ est extraite. La quantité de CTA^+ restant déterminée par Raman est de 45%. La surface spécifique, le volume poreux et la taille des pores sont plus faibles, ce qui confirme qu'il reste du CTA^+ à l'intérieur des pores. Lorsque l'extraction est réalisée en milieu acide (**méthode 3**), la libération du tensioactif est plus efficace puisqu'après une extraction, le taux de CTA^+ restant déterminé par Raman est seulement de 13%. Après trois extractions, la spectroscopie Raman confirme que le tensioactif a été extrait complètement. Les propriétés texturales confirment cette évolution puisque la surface spécifique, le volume poreux et la taille des pores augmentent avec le nombre de traitements. Une évolution similaire est observée lorsque les particules sont extraites avec le nitrate d'ammonium en milieu alcoolique (**méthode 4**). Nous démontrons aussi qu'il est possible d'extraire complètement le tensioactif en combinant un traitement acide et un traitement au nitrate d'ammonium (**méthode 5**). En comparant, les taux déterminés par ATG et spectroscopie Raman, on s'aperçoit que dans la plupart des cas, le taux déterminé par ATG est légèrement supérieur. Cette différence provient du fait que l'analyse par ATG est moins précise car elle prend en compte la déshydroxylation et la perte de l'eau chimisorbée sur le matériau, ce qui surestime la quantité de CTA^+ restant. Pour l'extraction Soxhlet (**méthode 2**), le taux obtenu en Raman est supérieur à celui déterminé par ATG. Cela s'explique par la présence dans le matériau d'une quantité d'éthanol non-négligeable (bande intense à 879 cm^{-1}). L'éthanol possède aussi une bande très large à 2885 cm^{-1} , ce qui va contribuer à augmenter l'intensité de la bande du CTAB mesurée à 2850 cm^{-1} et ainsi maximiser le taux de CTA^+ restant [383].

Après l'extraction au nitrate d'ammonium, il est possible que des ions NH_4^+ soit toujours présents dans les canaux (interaction faible entre les ions NH_4^+ et les groupements silanolates SiO^- de surface). En spectroscopie Raman, les ions ammonium ont une bande de vibration entre 1400 et 1450 cm^{-1} [384]. Sur le spectre des MSNs extraites au nitrate d'ammonium, il n'y a pas de pics dans cette région. Les ions NH_4^+ ont donc induit des réactions acido-basiques avec les silanolates de surface pour générer des groupements silanols et de l'ammoniaque [378].

Avec trois méthodes différentes (**méthodes 3, 4 et 5**), nous avons démontré qu'il était possible d'extraire totalement le CTAB des canaux. Cependant, toutes ces méthodes ne sont pas équivalentes. La méthode à base d'acide chlorhydrique (**méthode 3**) permet après trois extractions successives de retirer la totalité du TA mais elle reste cependant très longue. La méthode utilisant le nitrate d'ammonium (**méthode 4**) est particulièrement intéressante car elle est très rapide et très efficace. La méthode combinée (**méthode 5**) est aussi très intéressante puisqu'elle est aussi très rapide mais implique une acidification du milieu, ce qui peut être contraignant lorsque le matériau est fonctionnalisé par des groupements organiques sensibles à pH acide. Par conséquent, la méthode retenue est celle utilisant le nitrate d'ammonium (**méthode 4**).

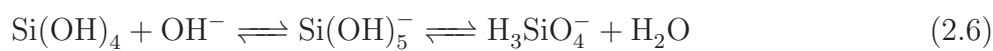
2.1.6 Influence du mode de conservation des MSNs

2.1.6.1 Mise en évidence de l'effet de l'humidité de l'air sur les propriétés structurales et texturales des MSNs

L'exposition de la silice amorphe à une solution aqueuse ou à l'humidité de l'air, conduit à l'hydrolyse du réseau silicaté par rupture des liaisons pontantes Si-O-Si [292, 385, 386], et s'accompagne de la mise en place d'un équilibre correspondant à la réaction de désorption-adsorption de l'acide silicique $\text{Si}(\text{OH})_4$ à la surface de la silice selon l'équation suivante :



Cette réaction correspond à la dissolution de la silice qui est mesurée par la concentration de $\text{Si}(\text{OH})_4$ à l'équilibre. La solubilité de la silice dépend peu du pH entre 2 et 8 (chapitre 1), mais augmente rapidement au-delà de $\text{pH} = 9$ car elle est catalysée par les ions OH^- . En effet, le monomère $\text{Si}(\text{OH})_4$ formé est immédiatement déprotoné sous la forme d'un silicate anionique, ce qui entraîne le déplacement de l'équilibre (équ. 2.5) vers la solubilisation de la silice, engendrant la dissolution progressive de l'édifice silicaté, résumée par l'équation suivante [205] :



De plus, le catalyseur peut s'adsorber en surface de la silice et augmenter la coordination des atomes de silicium de surface, affaiblissant de ce fait les liaisons Si-O avec les autres atomes de silicium du réseau [205]. D'autre part, l'acide orthosilicique H_3SiO_4^- se trouve en équilibre avec des acides polysiliciques ($\text{Si}_2\text{O}_3(\text{OH})_4^{2-}$, $\text{Si}_3\text{O}_5(\text{OH})_5^{3-}$, $\text{Si}_4\text{O}_8(\text{OH})_4^{4-} \dots$), ce qui déplace d'autant plus l'équilibre de dissolution, surtout pour des valeurs de pH supérieures à 10 [205, 387]. En revanche, la silice amorphe est stable à pH acide. Par exemple, Finnie *et al.* observent qu'après 6 heures à $\text{pH} = 2$ aucune dissolution n'est observée [292].

La dissolution de la silice amorphe est favorisée par la présence de cations en solution, qui viennent complexer les silicates formés. Elle dépend également d'autres paramètres, tels que la nature de la silice (surface spécifique, taux de condensation, densité de silanols), de l'état d'agrégation ou de la taille de particules [388]. De plus, la solubilisation de la silice diminue avec la fraction volumique de l'eau dans le milieu [205]. Quantitativement, à 25 °C, la solubilité de la silice amorphe dans l'eau varie de 120 à 876 ppm lorsque le pH augmente de 6 à 10,6 [205].

En milieu biologique, l'adsorption de protéines en surface des particules crée une barrière de diffusion des formes solubles libérées de la surface lors de la dissolution et diminue la tension de surface (qui est un des moteurs de la dissolution), contribuant ainsi à diminuer la dissolution. L'étude de la dissolution de microparticules de silice dans du PBS seul ou avec 10% de sérum de veau foetal montre qu'en présence des protéines contenues dans le sérum, la dissolution des particules est diminuée d'environ 30% [292]. Cet effet a été attribué à l'adsorption

de protéines comme l'albumine en surface des particules [389, 390]. Ce phénomène dépend néanmoins de la nature des molécules présent dans le milieu et l'effet inverse peut observé. Par exemple, certaines polyamines permettent de favoriser la dissolution de nanoparticules de silice en imposant localement une solvation de la surface à l'interface entre la particule et la molécule [391]. De plus, l'adsorption étant un phénomène dynamique, les espèces biologiques s'échangent en permanence avec le milieu environnant, et des complexes protéine-forme soluble peuvent se former, ce qui accélère la dissolution [388, 392].

Dans le cas des matériaux mésostructurés siliciques, l'instabilité de la silice en milieu aqueux se traduit par l'altération voire la destruction de l'organisation à longue distance du réseau silicaté [385, 393]. Sayen *et al.* démontrent que le traitement d'une silice mésoporeuse de type MCM-41 en milieu aqueux catalysé par NaOH provoque un effondrement irrémédiable de la structure, ce qui se traduit par une perte totale des pics de réflexion caractéristiques de la mésostructure. Ils démontrent aussi que le même traitement mais réalisé en milieu alcoolique provoque le même phénomène mais de manière moins agressive [394]. Ce phénomène peut avoir lieu aussi par simple contact avec l'humidité de l'air [395, 396].

Un tel processus doit être observé dans le cas de nanoparticules mésoporeuses de silice de type MCM-41. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence sur les propriétés structurales et texturales d'un vieillissement à l'air ambiant pour deux types de particules :

test 1 : des MSNs **calcinées** sont laissées à l'air ambiant pendant 1 an.

test 2 : des MSNs **extraites par voie chimique** (méthode 5) sont laissées à l'air ambiant pendant 8 mois.

Pour les deux types d'échantillons, les propriétés structurales et texturales sont caractérisées avant et après l'étape de vieillissement. Les isothermes de sorption de N₂ et les diagrammes de diffraction des deux types de MSNs fraîchement extraites ou vieilles à l'air ambiant sont présentés sur les Figures 2.17 et 2.18. Les propriétés structurales et texturales des deux types de MSNs avant et après vieillissement sont indiquées dans le Tableau 2.10.

L'isotherme des MSNs **calcinées puis vieilles** présente une diminution des capacités d'adsorption de 20% ainsi qu'une faible diminution de la surface spécifique de 5% (Tableau 2.10). L'étape de condensation capillaire est aussi plus étalée et s'est décalée vers de plus basses pressions relatives, indiquant respectivement une distribution plus large ainsi qu'une diminution de la taille des pores. Même si le pic correspondant au plan (210) a diminué en intensité après le vieillissement, la structure hexagonale est conservée.

L'isotherme des particules **extraites par voie chimique puis vieilles** montre une diminution des capacités d'adsorption de 48% ainsi qu'une diminution de la surface spécifique de 20% (Tableau 2.10). Comme pour l'échantillon calciné, l'étape de condensation à des pressions relatives de $P/P_0 = 0,35$ est plus étalée et s'est aussi décalée vers des pressions relatives plus basses. Pour cet échantillon, le diffractogramme montre qu'après le vieillissement la réflexion (210) a disparu. L'arrangement hexagonal 2D est néanmoins préservé après le vieillissement même si les largeurs des autres pics ont augmenté et leurs intensités ont diminué.

Pour les deux échantillons, l'arrangement hexagonal après le vieillissement est conservé tandis que les volumes poreux ont très largement diminué, ce qui peut certainement s'expliquer par un effondrement de la structure qui a lieu de manière préférentielle à la surface des particules et limite l'accessibilité à la porosité [396]. Au regard des diminutions des volumes poreux après vieillissement, les structures des particules extraites sont plus sujettes à s'effondrer au contact de l'humidité de l'air que les particules calcinées, et ce, probablement parce que leur structure silicique est moins bien condensée [162].

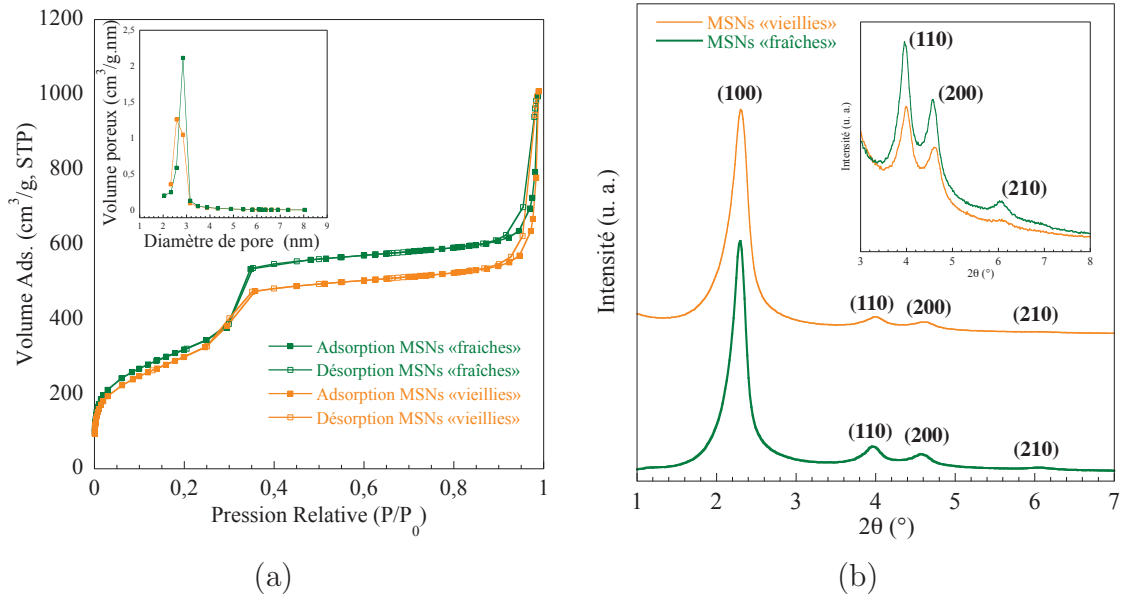


FIGURE 2.17 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction pour les échantillons fraîchement calcinés (vert) ou après 1 an à l'air ambiant (orange).

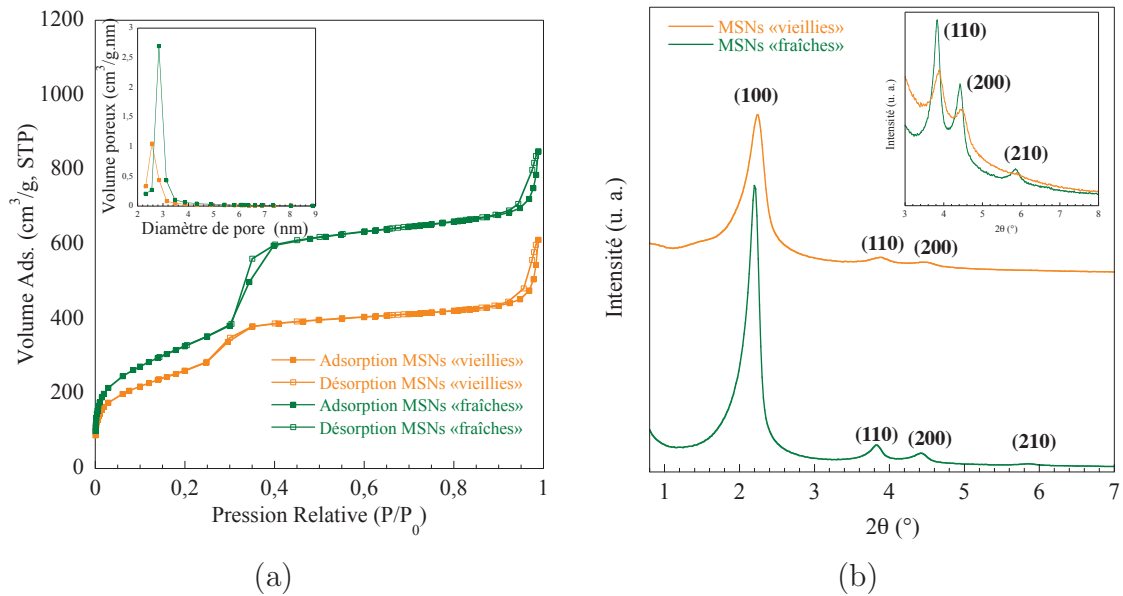


FIGURE 2.18 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons fraîchement extraits (vert) ou après 8 mois à l'air ambiant (orange).

2.1. Influence des conditions opératoires de synthèse

TABEAU 2.10 : *Propriétés structurales et texturales des MSNs fraîchement extraites ou vieilles à l'air ambiant.*

Conditions expérimentales	d^a (nm)	S_{BET} (m^2/g)	V_m (cm^3/g)	D_p (nm)
Calcination	3,86	1164	1,07	2,8
Calcination puis 1 an sous air	3,83	1109	0,86	2,8
Extraction chimique	4,05	1197	1,15	3,0
Extraction chimique puis 8 mois sous air	3,75	957	0,60	2,8

^a d : distance de corrélation correspondant au plan (100) déterminée à la fin des différents traitements.

Pour conclure, cette étude montre qu'il convient d'être précautionneux à l'égard de la conservation des nanoparticules et qu'il est nécessaire de les maintenir à l'abri de l'humidité de l'air. Lorsque les MSNs sont placées dans un dessiccateur sous vide dynamique, nous avons observées que leurs propriétés structurales et texturales sont conservées au minimum pendant 8 mois (durée de l'expérience).

2.1.6.2 Influence de la lyophilisation sur les propriétés structurales des MSNs

Plusieurs obstacles doivent être surmontés lorsque les nanoparticules doivent être utilisées à des fins thérapeutiques. L'instabilité physique (aggrégation/fusion des particules) ou encore l'instabilité chimique (dégradation du matériau) font partie de ces obstacles, surtout lorsque ces systèmes doivent être conservés pour de longue durée. La meilleure des solutions est de conserver les nanoparticules sous forme de poudre, c'est-à-dire après avoir éliminé le solvant. Le procédé le plus utilisé qui permet de transformer des solutions ou des suspensions sous la forme d'un solide suffisamment stable pour la distribution ou le stockage dans le domaine de la pharmacologie est la lyophilisation [397]. La lyophilisation est un procédé industriel qui consiste à éliminer le solvant d'un échantillon congelé par sublimation et désorption sous vide. Dans le domaine de la synthèse des colloïdes, la lyophilisation est surtout utilisée afin de conserver les particules sous forme solide soit pour des caractérisations ultérieures, soit pour de futures applications (nécessitant une bonne redispersion après élimination du solvant). Dans la littérature, on retrouve beaucoup d'exemples où l'élimination du solvant par lyophilisation permet par la suite une bonne re-dispersion des nanoparticules [398].

Dans le but de trouver une méthode d'élimination du solvant sans utiliser l'évaporation et ainsi permettre aux nanoparticules d'être plus facilement redispersables, nous avons cherché à savoir si la lyophilisation pouvait être appliquée à notre système. L'objectif était de savoir si les propriétés structurales et texturales des MSNs étaient préservées après lyophilisation. Trois essais ont donc été réalisés :

essai 1 : les MSNs sont lyophilisées avant extraction.

essai 2 : les MSNs sont lyophilisées après extraction.

essai 3 : les MSNs sont lyophilisées après calcination (ce test est purement fondamental car la calcination produit de l'aggrégation et est à proscrire pour des applications biomédicales).

Les isothermes de sorption de N_2 et les diagrammes de diffraction des échantillons ayant subi une lyophilisation sont présentés sur les Figures 2.19 et 2.20. Les propriétés structurales et texturales de ces échantillons sont indiquées dans le Tableau 2.11.

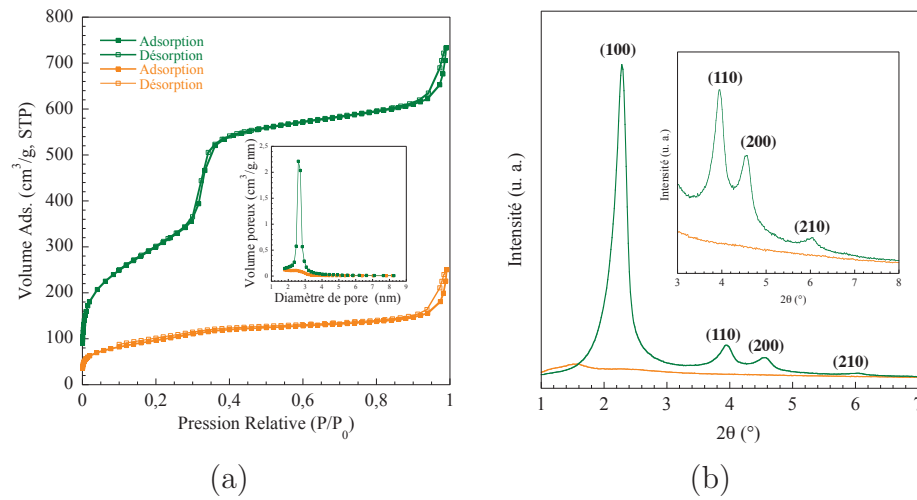


FIGURE 2.19 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons lyophilisés avant (vert) ou après extraction (orange).

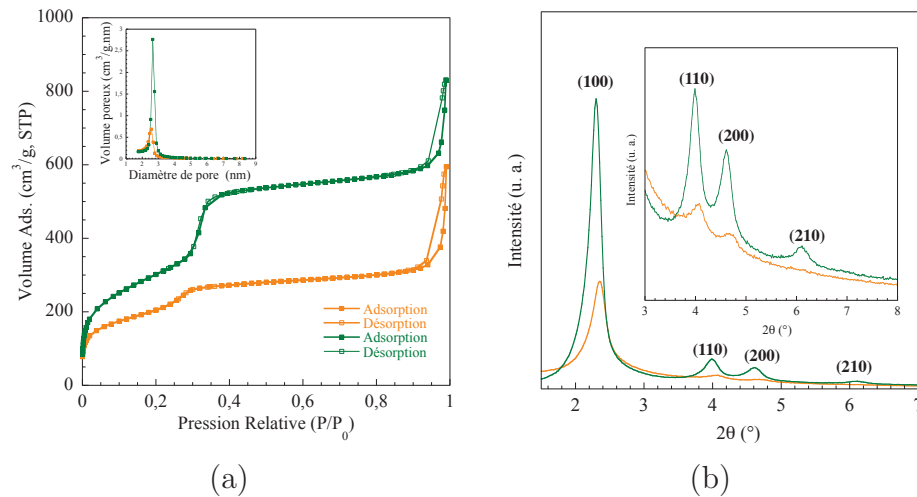


FIGURE 2.20 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons calcinés (vert) puis lyophilisés (orange).

TABLEAU 2.11 : Propriétés structurales et texturales des MSNs ayant subi une lyophilisation avant extraction, après extraction ou après calcination. Celles-ci sont comparées aux propriétés structurales des particules ayant subi une extraction ou une calcination. La surgélation est réalisée dans l'azote liquide (77K). L'élimination du solvant a lieu à une température de 193 K et une pression de 10 μ bar.

Conditions expérimentales	d ^a (nm)	S _{BET} (m ² /g)	V _m (cm ³ /g)	D _p (nm)
Extraction chimique	3,99	1124	1,08	3,0
Extraction chimique puis lyophilisation	-	343	0,17	2,6
Lyophilisation puis extraction chimique	3,88	1119	0,96	2,7
Calcination	3,85	1075	0,95	2,9
Calcination puis lyophilisation	3,76	720	0,45	2,6

Lorsque la lyophilisation est réalisée avant extraction, une isotherme typique réversible de type IV est observée. On retrouve à des pressions relatives $P/P_0 = 0,3$, la condensation capillaire caractéristique de la mésoporosité. Lorsque la lyophilisation est réalisée après extraction, l'isotherme typique des matériaux de type MCM-41 n'est plus observée et les propriétés texturales (S_{BET} , V_m et D_p) sont grandement modifiées (Tableau 2.11).

Contrairement à l'échantillon lyophilisé avant extraction, l'échantillon lyophilisé après extraction ne présente plus de pics de diffraction. Ces résultats prouvent que la lyophilisation après extraction du tensioactif provoque un effondrement de la structure interne des MSNs et est donc à proscrire. *A contrario*, la lyophilisation avant extraction du tensioactif ne détériore pas la structure. L'eau est l'un des rares éléments à avoir un volume plus important à l'état solide qu'à l'état liquide. Cette augmentation de volume lorsque l'échantillon est surgelé provoque la destruction des murs de silice et génère l'effondrement de la structure. Pour preuve, lorsque le CTAB est encore présent dans la structure, l'effondrement n'a pas lieu car l'eau ne peut pas diffuser à l'intérieur des canaux.

Lorsque la libération de la porosité est faite par voie thermique plutôt que par voie chimique, le réseau de silice est consolidé [71]. Est-il possible de préserver l'arrangement hexagonal après lyophilisation lorsque les particules ont été calcinées ? Pour répondre à cette question, les MSNs calcinées sont redispersées dans l'eau, surgelées puis lyophilisées.

Les isothermes de sorption de N_2 et les diffractogrammes de la Figure 2.20 montrent qu'un effondrement de la structure a quand même lieu. La condensation capillaire caractéristique de la mésoporosité est toujours visible mais pour de plus basses pressions relatives. Les quantités adsorbées et la surface spécifique ont diminué puisqu'elles passent de $0,95 \text{ cm}^3/\text{g}$ à $0,45 \text{ cm}^3/\text{g}$ et de $1075 \text{ cm}^3/\text{g}$ à $720 \text{ cm}^3/\text{g}$, respectivement. Le diffractogramme montre un décalage du pic de réflexion (100) vers les plus grands angles. Les pics de réflexion (100), (110) et (200) ont tous diminué en intensité et le pic (210) a disparu.

Tous ces résultats montrent que l'étape de surgélation lors de la procédure de lyophilisation provoque un effondrement de l'organisation structurale des nanoparticules poreuses, et ce, quelle que soit la méthode d'extraction. En revanche, la lyophilisation peut être employée lorsque le CTAB (CTA^+) est encore présent dans les canaux. Cette méthode sera utilisée pour éliminer toutes les traces d'eau contenues dans le matériau afin de fonctionnaliser la surface externe des MSNs dans un solvant organique anhydre (chapitre 3).

2.2 Stabilité colloïdale et structurale des MSNs

2.2.1 Rappels et hypothèses

L'un des objectifs de cette thèse est de proposer une méthode simple, rapide et reproductible permettant la synthèse d'une suspension colloïdale de MSNs parfaitement dispersées. Une telle suspension constitue un pré-requis dès lors que l'on souhaite fonctionnaliser les nano-

particules sans aucune étape de purification, c'est à dire de manière *in situ*. Cette méthode de fonctionnalisation peut être très avantageuse puisqu'elle permet de purifier les particules après greffage d'une molécule, qui leur confèrent une stabilisation par voie électrostatique ou stérique [18, 209, 213, 219, 399].

Dans toutes les études précédentes, la synthèse est basée sur le protocole publié par Cai *et al.*. Bien qu'il permette de synthétiser des nanoparticules de type MCM-41 (Figure 2.21), cette méthode ne permet pas d'obtenir une suspension colloïdale de MSNs parfaitement dispersées après synthèse. En effet, même si les ultrasons sont utilisés pour redisperser les particules après synthèse, la taille hydrodynamique augmente rapidement au cours du temps, ce qui est caractéristique d'une agrégation progressive des nanoparticules en suspension (Figure 2.22).

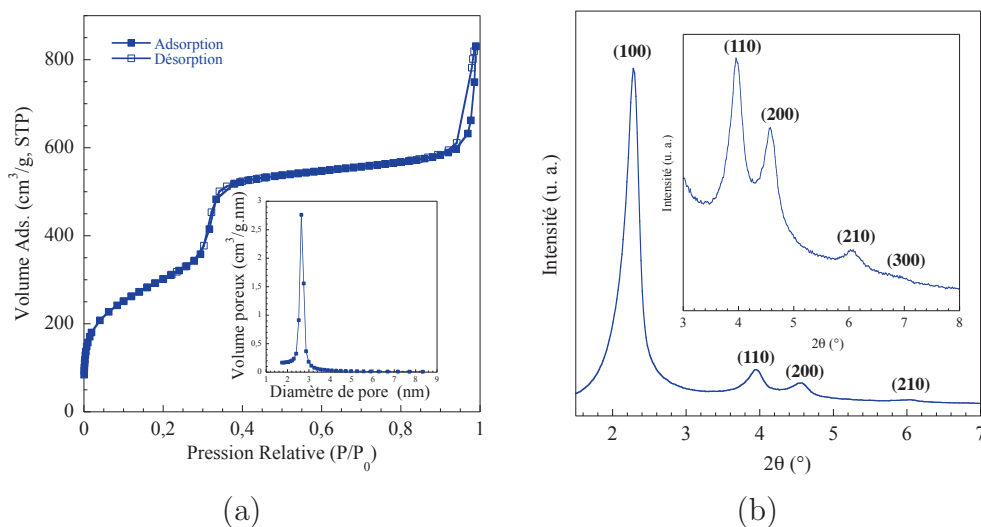


FIGURE 2.21 : (a) Isotherme de sorption de N_2 avec sa distribution en taille de pores et (b) diagramme de diffraction après calcination de l'échantillon synthétisé dans les conditions « standards ». La surface spécifique accessible, le volume poreux et la taille des pores valent $1075 \text{ m}^2/\text{g}$, $0,95 \text{ cm}^3/\text{g}$ et $2,9 \text{ nm}$, respectivement. La distance de corrélation du pic le plus intense vaut $3,85 \text{ nm}$ ($2\theta = 2,29^\circ$).

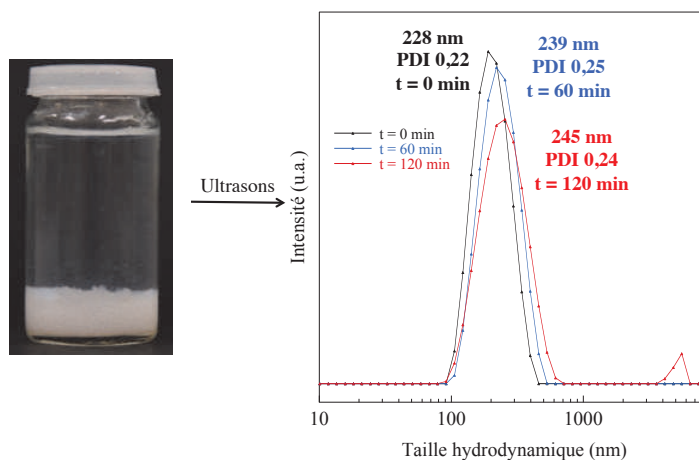


FIGURE 2.22 : Photo du précipité obtenu après deux heures de synthèse dans le cas des conditions « standards » et évolution avec le temps du diamètre hydrodynamique après redispersion aux ultrasons. Pour la mesure, les particules sont diluées 20 fois et redispersées aux ultrasons à $t = 0 \text{ min}$. L'atténuateur et la position sont maintenus fixes pour les trois mesures.

Même s'il est reporté dans la littérature quelques méthodes menant à la synthèse de suspensions colloïdales stables de MSNs, nous avons cherché à comprendre l'origine d'une telle instabilité. Le point de départ de nos observations ont été les clichés de microscopie des particules directement après synthèse (Figure 2.23). Comme le montrent ces clichés, de nombreux agrégats sont présents et les particules sont reliées entre elles par des « ponts » (flèches blanches).

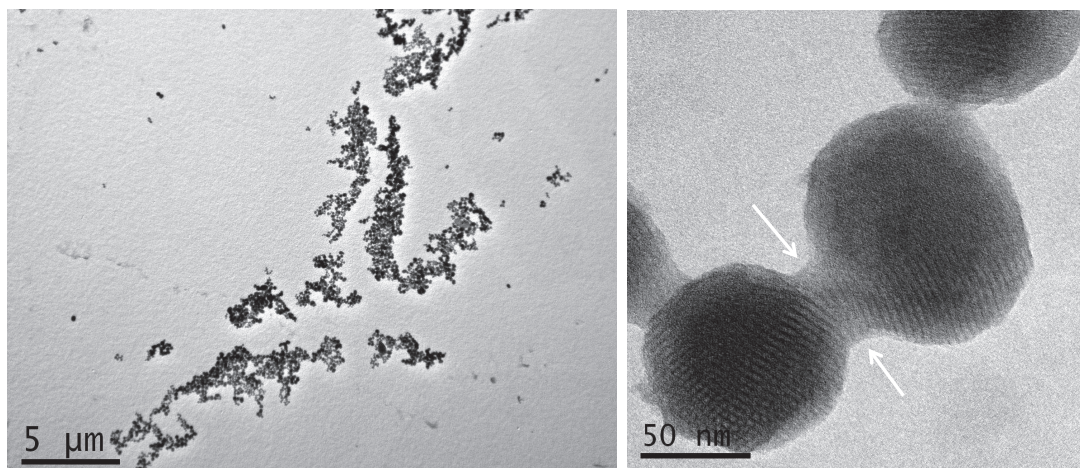


FIGURE 2.23 : Images MET des particules obtenues après deux heures de synthèse dans le cas des conditions « standards ».

Les nombreuses expériences réalisées pendant cette thèse nous ont permis de dégager deux hypothèses quant à la formation de ces ponts. Elles impliquent la présence dans le milieu réactionnel de l'éthanol (produit lors des réactions d'hydrolyse et de condensation) et des carbonates (formés lors de la dissolution du CO_2 de l'air dans la solution de soude). Cette partie est consacrée à l'étude de l'influence de la présence de ces deux composés sur la stabilité colloïdale obtenue après 2 heures de synthèse.

2.2.2 Démarche expérimentale

Afin de mettre en évidence que les carbonates ou l'éthanol peuvent avoir une influence sur la stabilité colloïdale, trois synthèses sont réalisées. Les modes opératoires sont résumés sur la Figure 2.24. Dans les trois cas, la vitesse d'agitation et la température sont fixes et égales à 700 rpm et 70 °C, respectivement. Les volumes de TEOS, de soude et d'eau sont les mêmes que ceux décrits dans le protocole en section 2.1.1.2. La masse de CTAB ajouté est aussi la même et est égale à 416,6 mg.

Dans l'expérience ❶, les conditions sont telles que la présence des **carbonates** et de **l'éthanol** produit lors de la synthèse sont minimisées. Pour ce faire, une purge du système est effectuée lors de l'étape de dissolution du CTAB. Une solution de soude « fraîche² » à 2 M est ensuite ajoutée au milieu réactionnel. Le système est maintenu pendant deux heures à 70 °C sous un balayage de N_2 de 150 mL/min. Afin de limiter la présence d'éthanol produit lors de la synthèse, le TEOS est ajouté sous un balayage d'azote de 1 L/min. Après 2 heures à 70 °C, le précipité blanc obtenu

2. fraîche : conservée en boîte à gants donc dépourvue de carbonates.

est lavé à l'eau déminéralisée par centrifugation (24 630 g, 20 minutes). Les centrifugations sont poursuivies jusqu'à ce que la conductivité des eaux de lavage soit inférieure à $10 \mu\text{S}/\text{cm}$. L'eau est ensuite éliminée à l'évaporateur rotatif à une température de 80°C . Afin de parfaire l'évaporation mais aussi renforcer la structure silicique des MSNs, la poudre est maintenue à 90°C sous vide pendant 1 heure. Dans le but d'éliminer le tensioactif, une calcination est ensuite réalisée dans les mêmes conditions que celles énoncées dans la section 2.1.1.2.

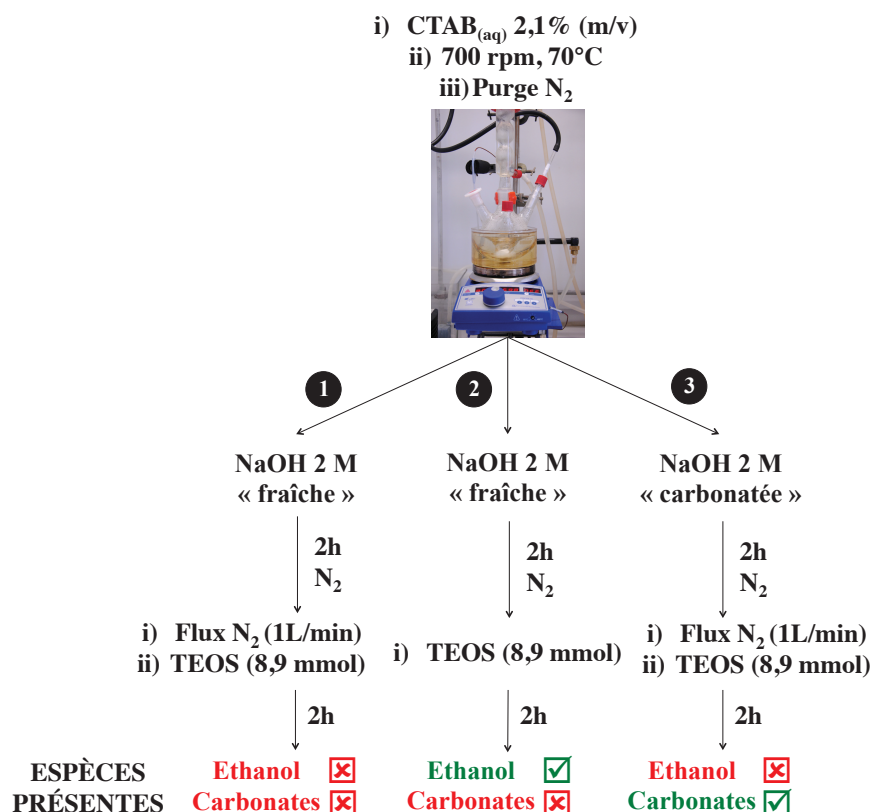


FIGURE 2.24 : Démarche expérimentale utilisée afin d'étudier l'effet de la présence des carbonates et de l'éthanol sur la synthèse des MSNs. NaOH 2 M « fraîche » : solution de soude conservée en boîte à gants, par conséquent dépourvue de carbonates. NaOH 2 M « carbonatée » : solution de soude stockée dans des conditions classiques, i. e. à l'air.

Dans l'expérience ②, il n'y a que la présence des **carbonates** qui est **minimisée**. Dans ce protocole, l'éthanol produit lors de la synthèse n'est pas éliminé par un flux de N₂. Pour cela, une purge du système est faite lors de l'étape de dissolution du CTAB. Une solution de soude « fraîche » à 2 M est ensuite ajoutée au milieu réactionnel. Le système est maintenu pendant deux heures à 70°C sous un balayage de N₂ de 150 mL/min. Le flux de N₂ est ensuite stoppé et le système fermé avant l'ajout de TEOS. La réaction est ensuite maintenue pendant 2 heures à 70°C sans balayage de N₂ (l'éthanol produit lors des réactions d'hydrolyse et de condensation est donc présent en solution). Le précipité blanc obtenu est lavé à l'eau déminéralisée et à l'éthanol jusqu'à ce que la conductivité soit inférieure à $10 \mu\text{S}/\text{cm}$. L'éthanol est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif dont la température est fixée à 80°C . Afin de parfaire l'évaporation mais aussi renforcer la structure silicique des MSNs, la poudre est maintenue à 90°C sous vide pendant 1 heure. La calcination est ensuite réalisée dans les mêmes conditions que l'expérience ①.

Dans l'expérience ③, un très large excès de carbonates est présent dans le milieu réactionnel. Une purge du système est faite lors de l'étape de dissolution du CTAB. Une solution de soude stockée dans des conditions classiques, c'est-à-dire **carbonatée** (dont le taux de carbonatation sera déterminé par spectroscopie Raman) est ensuite ajoutée au milieu réactionnel à la place d'une soude « fraîche » à 2 M. Le système est maintenu pendant deux heures à 70 °C sous un balayage de N₂ de 150 mL/min. Puis, le TEOS est ajouté sous un balayage d'azote de 1 L/min. La réaction est ensuite maintenue pendant 2 heures à 70 °C. Le précipité blanc obtenu est lavé à l'eau déminéralisée et à l'éthanol jusqu'à ce que la conductivité soit inférieure à 10 μ S/cm. L'éthanol est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif à 80 °C. Dans le même but que précédemment, la poudre est maintenue à 90 °C sous vide pendant 1 heure. La porosité est libérée par calcination dans les mêmes conditions que les deux expériences introduites précédemment.

Avant de présenter les propriétés morphologiques des matériaux obtenus pour ces trois expériences, il est nécessaire de montrer qu'en utilisant un flux de N₂, il est possible de limiter la présence de l'éthanol dans le milieu réactionnel. Il est aussi primordiale de quantifier le taux de carbonatation de la soude utilisée durant l'expérience ③. Ces deux points feront l'objet des deux parties suivantes.

2.2.3 Dosage par spectroscopie Raman de l'éthanol contenu dans les surnageants

Dans le but de savoir si la présence du flux de N₂ permet d'éliminer l'éthanol, nous avons dosé l'éthanol présent dans les surnageants par spectroscopie Raman [400] pour les expériences réalisées avec et sans flux de N₂. Le spectre Raman d'une solution aqueuse contenant 5% (v/v) d'éthanol technique ainsi que les spectres des surnageants des synthèses réalisées avec ou sans flux sont présentés sur la Figure 2.25(a).

L'éthanol présente de nombreuses bandes de vibration entre 700 et 1800 cm⁻¹. Les bandes de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons C-C-O, notées respectivement $\nu_s(\text{CCO})$ et $\nu_a(\text{CCO})$ apparaissent à 880 et 1045 cm⁻¹. Les bandes à 1085 et 1277 cm⁻¹ correspondent respectivement aux vibrations de déformation dans et hors du plan du groupement méthyle CH₃, notées $\delta(\text{CH}_3)$ et $\omega(\text{CH}_3)$. La vibration de déformation des liaisons C-OH, notée $\delta(\text{COH})$ apparaît à 1455 cm⁻¹ [401].

Sur la Figure 2.25(a), les pics caractéristiques de l'éthanol apparaissent sur le spectre du surnageant correspondant à la synthèse réalisée sans flux de N₂ tandis qu'ils n'apparaissent pas sur le spectre de la synthèse réalisée avec le flux de N₂. Par conséquent, l'éthanol produit lors de la synthèse est éliminé efficacement par le flux de N₂.

Afin de quantifier l'éthanol présent, on réalise une droite d'étalonnage avec des solutions aqueuses contenant 0,1 à 5% (v/v) d'éthanol technique. Le pic à partir duquel l'étalonnage est réalisé est celui à 880 cm⁻¹. Celui-ci est en effet le plus intense sur toute la gamme spectrale étudiée (Figure 2.25(b)). Une droite d'équation $y = -1067,3 + 1,139.10^5x$ et de coefficient de

corrélation $R = 0,99$ est obtenue. En considérant la réaction bilan (équ. 1.4) totale et en tenant compte du volume molaire de l'éthanol, la concentration volumique théorique d'éthanol dans le milieu est d'environ 1% (v/v). Pour les surnageants des synthèses réalisées avec et sans flux **pendant toute la durée de la synthèse**, les concentrations en éthanol valent respectivement 0,06 et 0,55% (v/v), soit neuf fois plus dans le cas de la synthèse réalisée sans flux de N_2 . Ceci confirme bien que l'élimination de l'éthanol produit lors de la réaction d'hydrolyse du TEOS est grandement favorisée par le flux de N_2 .

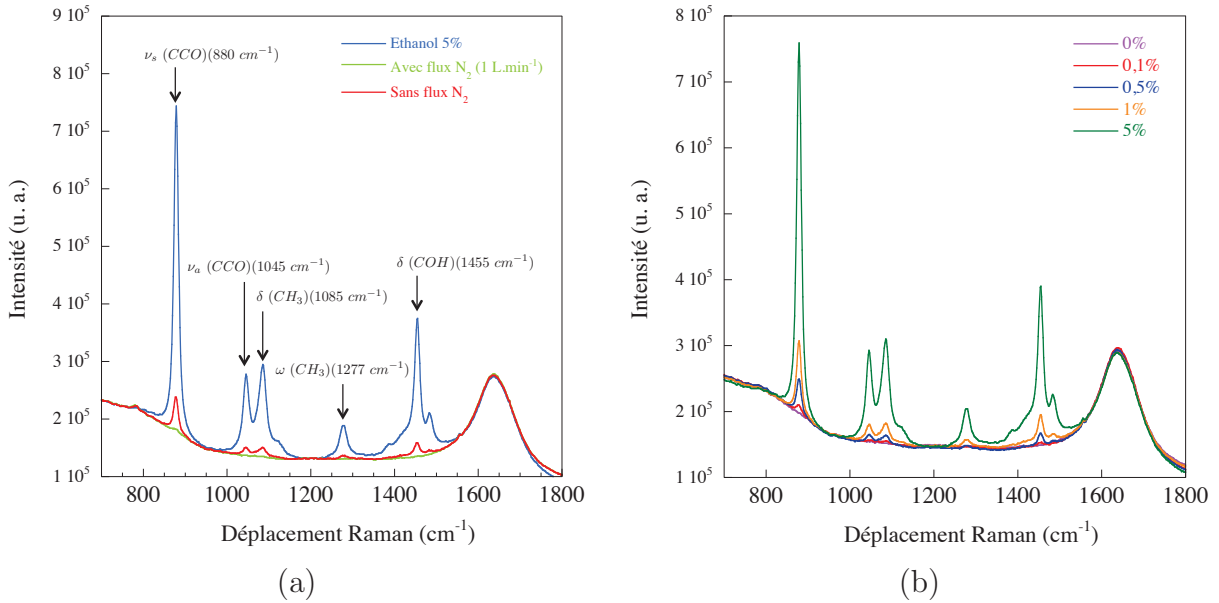
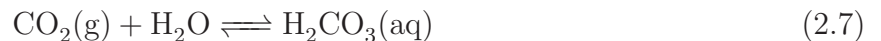


FIGURE 2.25 : (a) Spectres Raman d'une solution aqueuse contenant 5% (v/v) d'éthanol technique et des surnageants des synthèses réalisées avec et sans flux de N_2 , (b) Spectres Raman entre 600 et 1800 cm^{-1} de solutions d'éthanol à différentes concentrations volumiques. Longueur d'onde d'excitation du laser $\lambda = 532\text{ nm}$.

2.2.4 Dosage par spectroscopie Raman des carbonates présents dans une solution de soude « vieille »

Lorsqu'une solution d'hydroxyde de sodium est mise en contact avec l'air ambiant, la dissolution du dioxyde de carbone de l'atmosphère provoque l'acidification de la solution. En effet, le dioxyde de carbone de l'atmosphère se dissout dans l'eau pure selon la loi de Henry pour former l'acide carbonique H_2CO_3 par hydratation selon l'équation ci-dessous :



L'acide carbonique est un diacide faible caractérisé par les constantes d'acidité K_{a1} et K_{a2} (données ici pour 25 °C) :



2.2. Stabilité colloïdale et structurale des MSNs

En combinant ces expressions faisant intervenir les constantes d'acidité et en définissant la somme des concentrations des espèces carbonates C_T , on montre que les rapports $\frac{[H_2CO_3]}{C_T}$, $\frac{[HCO_3^-]}{C_T}$ et $\frac{[CO_3^{2-}]}{C_T}$ ne dépendent que du pH. En traçant ces rapports en fonction du pH, on obtient le graphique de la Figure 2.26. Cette courbe nous permet de connaître l'espèce qui prédomine en dans la solution de soude dont nous souhaitons connaître le pourcentage de carbonatation. Compte tenu de la concentration de la solution de soude utilisée (2 M), l'espèce majoritaire présente en solution est l'ion carbonate $CO_3^{2-}(aq)$.

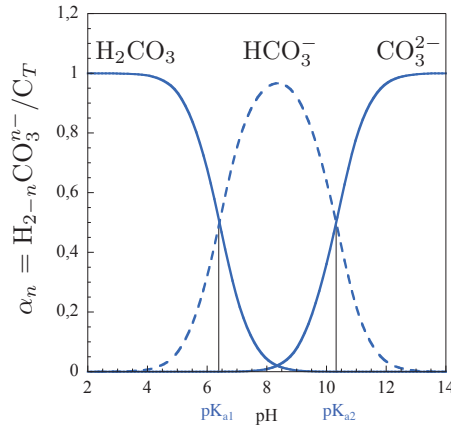


FIGURE 2.26 : Variation en fonction du pH du rapport $\alpha_n = H_{2-n}CO_3^{n-}/C_T$ avec $n = 0, 1, 2$.

Les spectres Raman de solutions de carbonate de sodium ainsi que de la solution de soude carbonatée sont présentés sur la Figure 2.27 pour des déplacements Raman entre compris 600 et 1800 cm^{-1} . L'ion carbonate CO_3^{2-} de symétrie D_{3h} a six modes normaux de vibrations, dont les représentations irréductibles sont $A'_1 + A'_2 + 2E'$. Les modes actifs en Raman sont $A'_1 + 2E'$ et représentent les modes ν_1 , ν_3 et ν_4 . Le mode d'élongation symétrique ν_1 , noté $\nu_s(OCO)$, est la bande intense observée à 1066 cm^{-1} sur la Figure 2.27(a). La bande d'élongation anti-symétrique ν_3 , notée ($\nu_a(OCO)$), est beaucoup moins intense que ν_1 et apparaît à 1363 cm^{-1} . La bande de déformation anti-symétrique ν_4 , notée $\delta_a(OCO)$, apparaît à 680 cm^{-1} . Une dernière bande très large correspondant à la vibration d'élongation symétrique de la liaison C=O apparaît aux alentours de 1639 cm^{-1} [402–404]. Les bandes moins intenses comme $\nu_a(OCO)$ et $\delta_a(OCO)$ n'apparaissent pas sur le spectre de la solution de soude carbonatée tandis qu'elles apparaissent sur le spectre de la solution d'hydrogénocarbonate à 2 M. Un autre pic caractéristique de la vibration d'élongation symétrique C-OH des ions hydrogénocarbonates [405] apparaît à 1017 cm^{-1} mais uniquement sur le spectre de la solution de carbonate de sodium à 2 M. Ceci confirme également que l'espèce majoritaire présente dans la solution de soude est l'ion carbonate CO_3^{2-} ou que la concentration de l'espèce HCO_3^- n'est pas suffisante pour que le pic des liaisons C-OH puisse être observé.

D'après les spectres de la Figure 2.27(b), l'intensité de la bande à 1066 cm^{-1} est proportionnelle à la concentration de carbonate en solution. Par conséquent, elle peut être utilisée pour quantifier la concentration en carbonate d'une solution inconnue. Pour cela, un étalonnage est réalisé en mesurant l'intensité de la bande à 1066 cm^{-1} pour des solutions de carbonate de sodium dont les

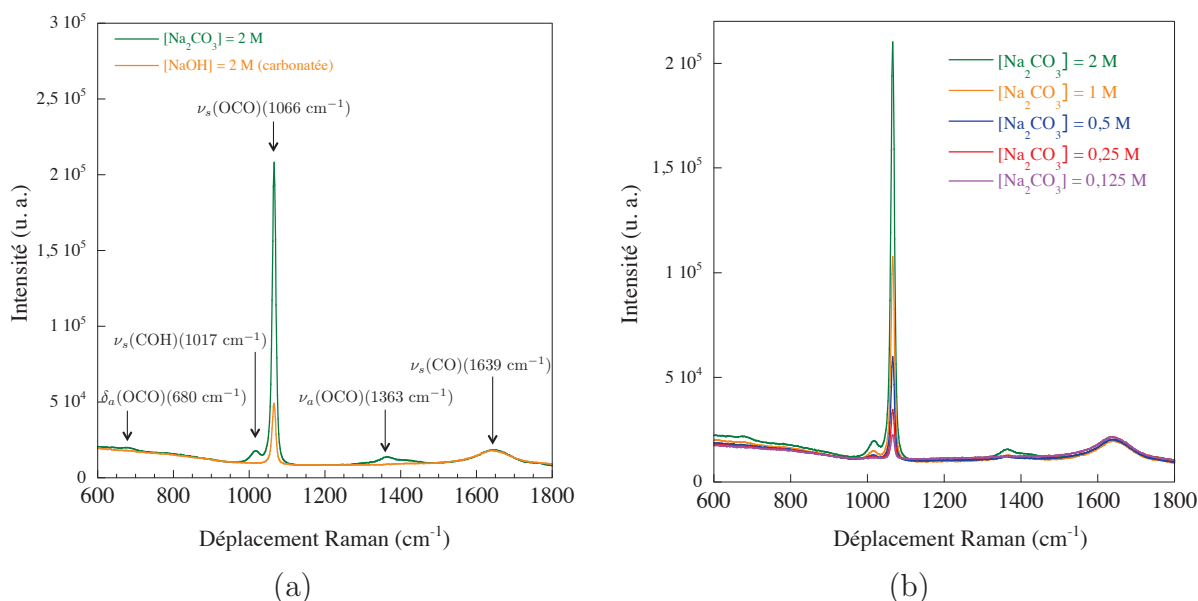


FIGURE 2.27 : (a) Spectres Raman d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 2 M et d'une solution de soude carbonatée initialement à 2 M (à l'air pendant une semaine), (b) Spectres Raman de solutions de carbonate de sodium à différentes concentrations. Longueur d'onde d'excitation du laser $\lambda = 532 \text{ nm}$.

concentrations sont comprises entre 0,125 M et 2 M. Une droite d'équation $y = -519,09 + 99421x$ est obtenue. On remarque aussi que la bande caractéristique de la vibration d'élongation symétrique C-OH des ions hydrogénocarbonate à 1017 cm^{-1} est présente pour quasiment toutes les concentrations et que son intensité est proportionnelle à la concentration des ions carbonate CO_3^{2-} . Nous avons donc une faible proportion d'ions hydrogénocarbonate HCO_3^- en solution. En conséquence, la concentration en ions carbonate de la solution inconnue sera donc légèrement surestimé. Pour la solution de soude carbonatée, l'intensité de la bande à 1066 cm^{-1} est de 39860 (u. a.), ce qui correspond à une concentration en ions carbonate de 0,408 M, soit une solution de soude carbonatée à 40,8%. Après ajout de la solution de soude dans la solution aqueuse de CTAB, la concentration totale des carbonates C_T est égale à 0,31 g/L.

2.2.5 Propriétés morphologiques des matériaux obtenus

Les distributions en taille obtenues par diffusion de la lumière des trois expériences sont indiquées sur la Figure 2.28. Les images de microscopie électronique des échantillons correspondants sont présentées sur la Figure 2.29.

Lorsque que le milieu réactionnel est dépourvu de carbonates et d'éthanol (expérience ❶), la distribution en taille est très resserrée ($\text{PDI} = 0,04$) et le diamètre hydrodynamique des particules est de 167 nm. Dans ces conditions de synthèse, la suspension obtenue après deux heures de synthèse est stable pendant plusieurs mois (incrustation de la Figure 2.29). Lorsque que dans le milieu réactionnel, l'éthanol ou les carbonates sont présents, les distributions obtenues en diffusion de la lumière sont beaucoup plus larges et centrées à 249 et 752 nm, respectivement. Dans le cas des carbonates, il existe même deux populations, centrées à environ 300 et 1000 nm.

2.2. Stabilité colloïdale et structurale des MSNs

La stabilité colloïdale après 2 heures de synthèse dépend également de la présence de l'éthanol et des carbonates en solution. En effet, les suspensions colloïdales obtenues dans les expériences ❷ et ❸ sédimentent instantanément lors de l'arrêt de l'agitation.

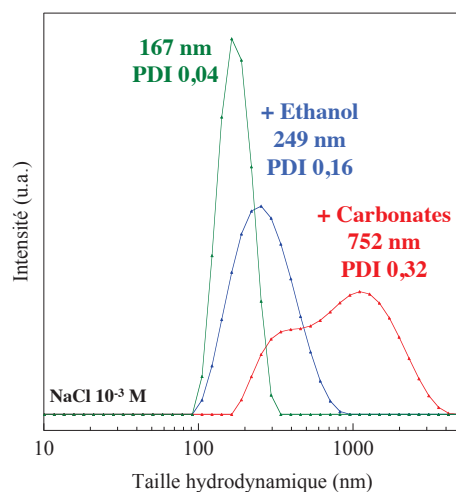


FIGURE 2.28 : Distributions en taille DDL obtenues pour les trois expériences après synthèse.

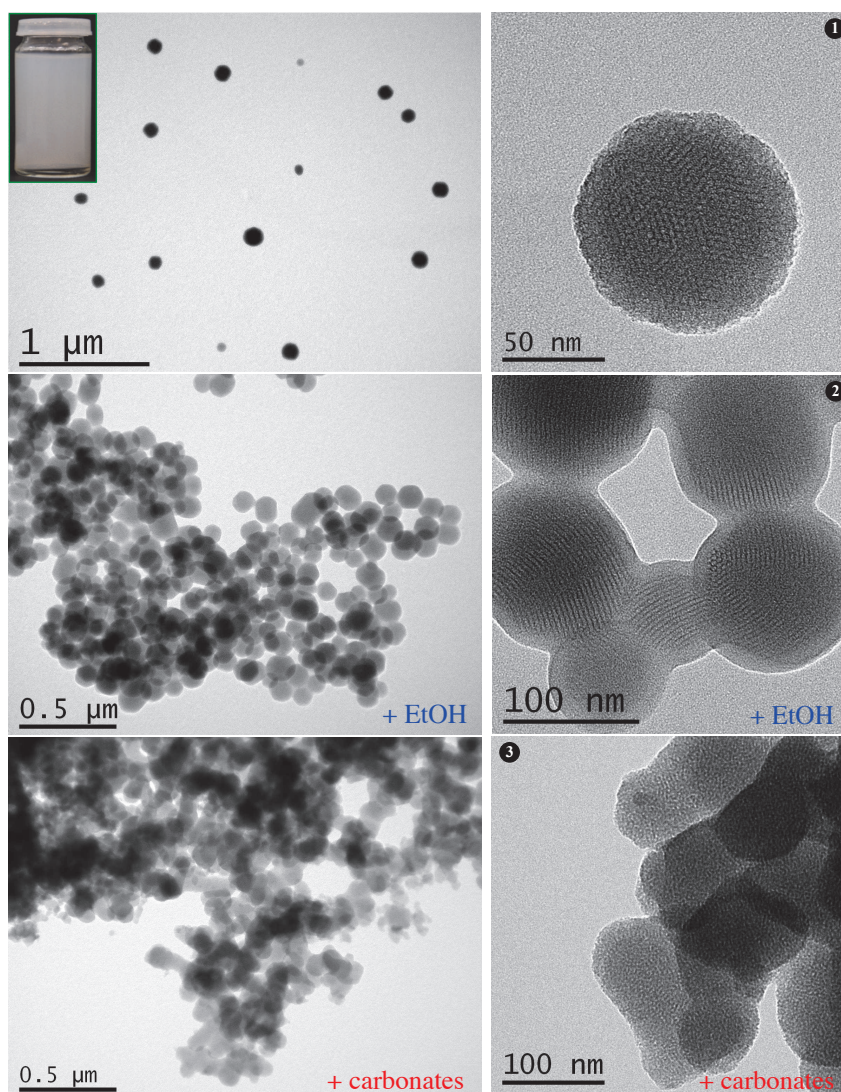


FIGURE 2.29 : Images MET des échantillons obtenus pour les expériences ❶, ❷ et ❸.

Les clichés de microscopie de la Figure 2.29 corroborent ces résultats. En effet, lorsque le milieu est exempt de carbonates et d'éthanol (expérience ❶), la distribution de taille MET est monodisperse ($c_v = 0,18$) et les particules sont bien dispersées (Figure 2.29). Lorsque l'éthanol est présent dans le milieu réactionnel (expérience ❷), les images MET montrent des particules reliées par des « ponts » (Figure 2.29), ce qui cohérent avec une augmentation de la distribution en taille DDL (Figure 2.28). Lorsque des carbonates sont présents dans le milieu réactionnel (expérience ❸), les clichés de microscopie montrent des « particules » agglomérées sans forme définie (Figure 2.29). Dans ces conditions, la structure interne des particules n'est plus hexagonale, ce qui est confirmé par la présence sur le diffractogramme d'un seul pic très large et asymétrique (résultat non-montré). Néanmoins, ces « particules » sont toujours mésoporeuses puisqu'une isotherme de type IV est toujours observée lors de la sorption de N_2 . La surface spécifique et le volume poreux obtenus pour ce matériau valent $1264 \text{ m}^2/\text{g}$ et $0,96 \text{ cm}^3/\text{g}$, respectivement.

2.2.6 Discussion à propos de l'effet de la présence des carbonates et de l'éthanol

Lorsqu'un excès de carbonate est présent dans le milieu réactionnel, la morphologie et la structure des MSNs sont modifiées. Nous obtenons des « nano-objets » très mal définis d'un point de vue morphologique et non-mésosstructurés. Dans ce cas, trois raisons peuvent être envisagées : (i) la diminution de la concentration en soude (pH moins basique) modifie les cinétiques d'hydrolyse et de condensation et la présence des ions carbonates CO_3^{2-} et hydrogénocarbonates HCO_3^- n'a aucun effet, (ii) les ions carbonates CO_3^{2-} et hydrogénocarbonates HCO_3^- forment un complexe avec le CTA^+ de la forme $([\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}](\text{CH}_3)_3 \cdot \text{N}^+)_2\text{CO}_3^{2-}$ [406], ce qui atténue et induit une diminution des interactions électrostatiques entre la surface des micelles du tensioactif et les silicates, provoquant ainsi une augmentation du degré de polymérisation et perturbant ainsi l'ensemble du mécanisme de formation des MSNs [346, 407], (iii) les carbonates s'adsorbent en surface des agrégats des micelles hybrides $\text{CTA}^+/\text{silicate}$ et provoque la coagulation des particules.

Lorsque l'éthanol produit lors des réactions d'hydrolyse et de condensation n'est pas éliminé par le flux de N_2 , les particules sont « pontées » et présentent toujours une structure caractéristique des matériaux de type MCM-41. L'éthanol est utilisé dans de nombreux procédés de synthèse parce qu'il peut jouer le rôle de co-tensioactif ou d'agent solvant [92, 408]. De plus, il est connu que l'éthanol permet d'augmenter la **miscibilité** entre le TEOS et l'eau, ce qui contribue à faciliter les réactions d'hydrolyse et de condensation [409, 410]. Dans notre système, en présence du flux de N_2 , l'éthanol est éliminé de la solution au fur et à mesure qu'il est généré par l'hydrolyse du TEOS. En conséquence, la surface de contact entre le TEOS et l'eau est minimale (formation d'une émulsion), ce qui ralentit les vitesses d'hydrolyse et de condensation. A l'échelle macroscopique, cela se traduit par une augmentation du temps de précipitation (1 minute 50 sans flux de N_2 contre 2 minutes 10 avec un flux de N_2). Une autre hypothèse possible est que la

présence d'éthanol faciliterait les transferts de matière entre les particules pendant leur formation par augmentation de la flexibilité des micelles de CTAB adsorbées à leur surface, comme cela est proposé dans le cadre de la synthèse de nanoparticules de silice par voie microémulsion [362].

2.2.7 Propriétés physico-chimiques des MSNs obtenues pour une synthèse réalisée sous N_2 et dans les conditions « standards »

Les propriétés physico-chimiques des deux types de particules sont présentées dans le Tableau 2.12. Les distributions en taille DDL, les diagrammes de diffraction et les isothermes sont indiqués respectivement sur les Figures 2.30 et 2.31. Les spectres RMN ^{29}Si MAS en simple impulsion des deux échantillons sont présentés sur la Figure 2.32.

TABEAU 2.12 : Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des différents matériaux obtenus pour les synthèses réalisées soit dans les conditions « standards », soit en présence d'un flux de N_2 .

Cond. exp.	d_{DDL} (nm) (PDI)	d_{MET} (nm) (c_v)	d^a (nm)	D_{cond}	P_{cont} (%)	S_{BET} (m^2/g)	V_m (cm^3/g)	D_p (nm)	$\text{SiO}_2/\text{CTA}^{+b}$ (mol/mol)	η^c (%)
Stand.	228 (0,22)	122 (0,17)	3,85	1,3	6	1075	0,95	2,9	7,1	75
N_2	167 (0,04)	135 (0,22)	3,54	0,7	10	1310	0,98	2,4	3,9	45

^a d : distance de corrélation déterminé après calcination ; ^b $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$: Déterminé par ATG ; ^c η : Rendement de synthèse calculé après calcination.

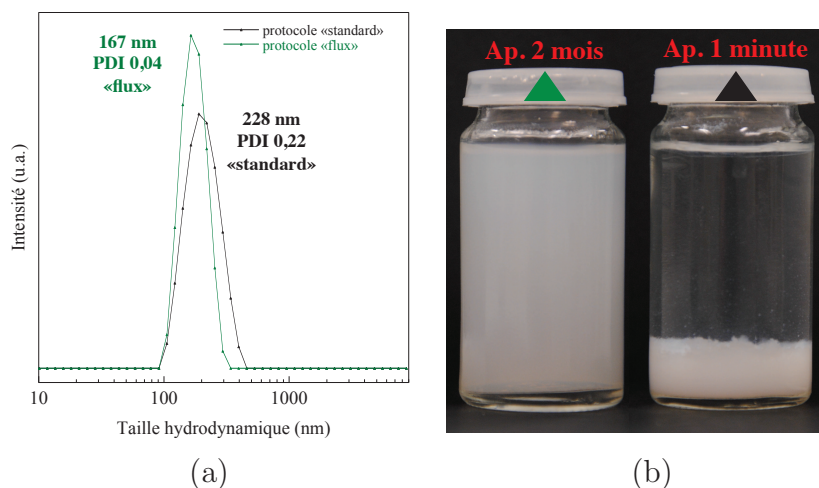


FIGURE 2.30 : (a) Diamètres hydrodynamiques des MSNs après synthèse. (b) Photos des suspensions pour le protocole « standard » (triangle noir) et le protocole « flux de N_2 » (triangle vert).

Contrairement à la synthèse « standard », la suspension colloïdale obtenue lorsque la synthèse est réalisée sous flux de N_2 reste stable pendant plusieurs mois (Figure 2.30(b)). Par rapport à la synthèse « standard », la taille hydrodynamique est beaucoup plus faible puisqu'elle est égale à 167 nm (contre 228 nm pour la synthèse « standard »). Le PDI est lui aussi inférieur et égal à 0,04. Par comptage, les tailles MET obtenues pour les deux synthèses sont très proches et égaux

à environ 130 nm. La diminution du PDI provient donc d'une agrégation moindre des particules en solution. De plus, contrairement à ce qui est observé pour les conditions « standards », le diamètre hydrodynamique n'augmente pas avec le temps pour la synthèse « flux de N_2 ».

Les potentiels zêta mesurés directement après synthèse³ sont aussi différents puisqu'égaux à $+(47 \pm 6)$ mV pour la synthèse faite sous flux contre $+(29 \pm 4)$ mV pour les conditions « standards ». Le signe positif du potentiel est attribué à la présence de CTAB adsorbé en surface des nanoparticules. En l'absence d'éthanol et de carbonates, il est possible qu'une plus grande quantité de CTA^+ puisse s'adsorber en surface des particules.

Par rapport à l'échantillon « standard », l'isotherme de sorption de N_2 de l'échantillon synthétisé sous flux de N_2 montre que l'étape de condensation capillaire caractéristique de la mésoporosité a toujours lieu mais pour de plus basses pressions relatives, indiquant ainsi une diminution de la taille des canaux. La distribution en taille des pores est plus large et la surface spécifique plus importante puisqu'elle est passée de 1075 m^2/g à 1310 m^2/g . Le diffractogramme confirme ces résultats puisque pour l'échantillon synthétisé sous flux de N_2 , les intensités des pics de réflexion sont plus faibles, les positions décalées vers de plus courtes distances et les largeurs à mi-hauteur plus importantes. Le pic de réflexion (210) a également disparu.

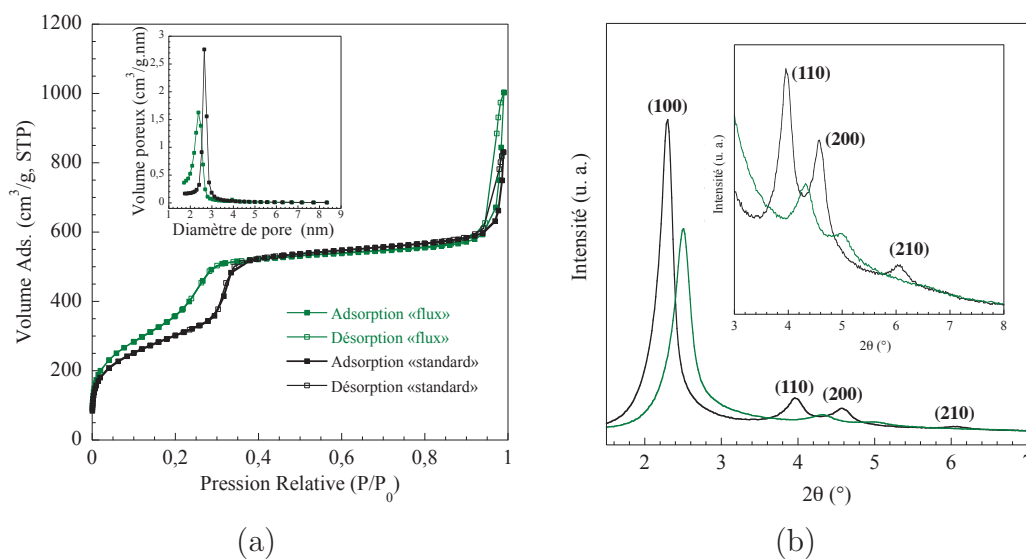


FIGURE 2.31 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction après calcination des échantillons synthétisés dans les conditions « standards » (courbe noire) ou en utilisant un flux de N_2 pendant toute la durée de synthèse (courbe verte).

Pour les deux échantillons, les spectres RMN ^{29}Si présentent trois résonances Q^4 (-110 ppm), Q^3 (-100 ppm) et Q^2 (-90 ppm), caractéristiques du réseau silicique. Les déconvolutions des spectres réalisées avec le logiciel Dmfit [357] montrent que les pourcentages des espèces Q^4 , Q^3 et Q^2 valent respectivement 57, 36 et 7% pour l'échantillon synthétisé dans les conditions « standards », et 42, 49 et 9% pour l'échantillon synthétisé sous flux de N_2 . Au regard de la proportion des espèces Q^4 et Q^3 , l'échantillon synthétisé sous flux de N_2 présente des particules dont la charpente silicique est moins condensée. Après calcul du taux de condensation (D_{cond}),

3. Mesuré à pH = 7, [MSNs] = 0,6 mg/mL et [NaCl] = 10^{-2} M.

on s'aperçoit qu'il diminue drastiquement lorsque la synthèse est réalisée sous flux puisqu'il passe de 1,3 à 0,7 (Tableau 2.12).

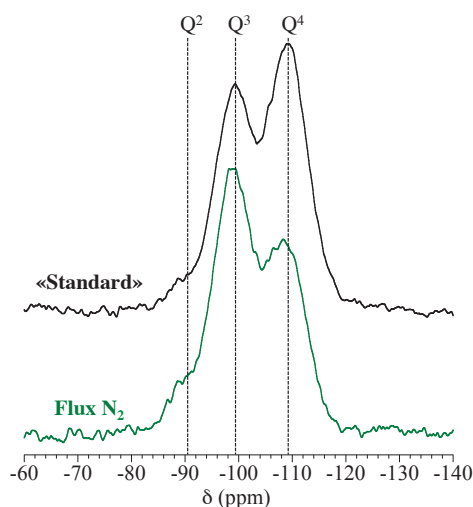


FIGURE 2.32 : Spectres RMN ^{29}Si MAS en simple impulsion des MSNs synthétisées dans les conditions « standards » ou en présence d'un flux de N_2 .

Pour finir, lorsqu'un flux de N_2 est appliqué pendant la synthèse, le rapport $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ et le rendement η diminuent drastiquement. Pour des applications biomédicales, les particules synthétisées sous flux de N_2 semblent être un bon point de départ car elles ne présentent pas de ponts et sont bien dispersées en solution après synthèse. Cependant, leur taux de condensation reste très faible et il se pourrait qu'elles soient trop fragiles pour envisager par la suite une quelconque encapsulation. De plus, il sera par la suite nécessaire d'étudier les profils de diffusion de l'anticancéreux en fonction par exemple de la chimie de surface. Si la structure poreuse n'est pas stable en milieu aqueux, alors il ne s'agit plus de profils de diffusion mais de profils de dégradation. C'est pourquoi, nous avons cherché à caractériser la stabilité structurale des MSNs après extraction en contact direct avec le milieu aqueux.

2.2.8 Stabilité structurale en milieu aqueux des MSNs synthétisées avec ou sans flux de N_2

Dans une procédure typique, 100 mg de poudre sont dispersés dans 10 mL d'eau ultrapure et placés sous agitation. Après 24 heures, les particules sont lavées trois fois à l'eau déminéralisée (10 864 g, 10 minutes) afin d'éliminer les produits de dégradation et ainsi éviter leur reprecipitation. Après élimination du surnageant, les particules sont séchées à l'étuve à 70°C . Les isothermes de sorption de N_2 , les diagrammes de diffraction et les clichés de microscopie des deux échantillons, avant et après vieillissement sont présentés sur les Figures 2.33, 2.34 et 2.35, respectivement. Les propriétés physico-chimiques des différents échantillons sont indiquées dans le Tableau 2.13. Après extraction, les deux types de particules présentent des caractéristiques physico-chimiques typiques des matériaux de type MCM-41 (S_{BET} élevée, V_m élevé, isotherme de type IV et arrangement hexagonal 2D).

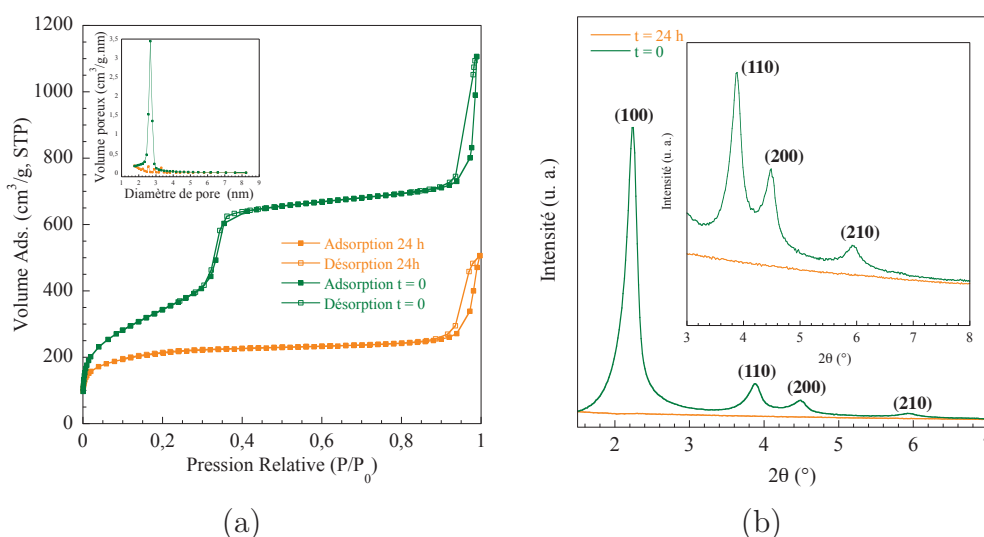


FIGURE 2.33 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés sous flux de N_2 après extraction (vert) ou après 24h dans l'eau (orange).

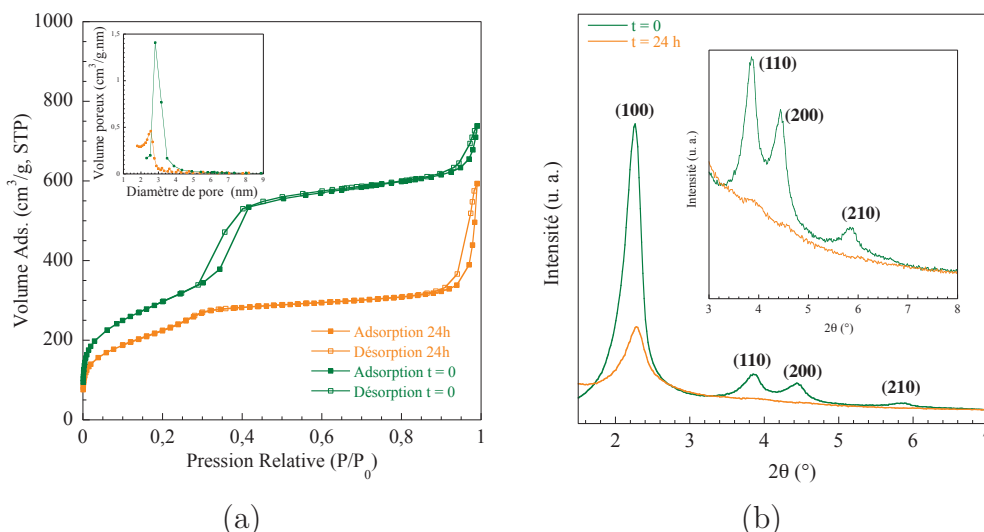


FIGURE 2.34 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés dans les conditions « standards » après extraction (vert) ou après 24 h dans l'eau (orange).

TABLEAU 2.13 : Propriétés physico-chimiques des MSNs après extraction ($4^*NH_4NO_3$ /éthanol) et après 24 h de vieillissement dans l'eau.

Cond. exp.	d^a (nm)	e^b (nm)	S_{BET} (m²/g)	V_m (cm³/g)	D_p (nm)	D_{cond}^c	SiOH ^d (mol%-Si)	SiOH/e (mol%-Si/nm)
Stand.	3,91	1,5	1080	1,08	3,0	1,3	50	32
Stand. 24h	3,88	-	835	0,44	2,5	-	-	-
N_2	3,96	1,7	1284	1,12	2,7	0,7	66	39
N_2 24h	-	-	732	0,17	2,4	-	-	-

^a d : Distance de corrélation du pic (100); ^b e : Taille du mur de silice $e = 2d_{100}/\sqrt{3} - D_p$; ^c D_{cond} : Taux de condensation déterminé par RMN après synthèse; ^dSiOH : Quantité de groupements silanols (SiOH) par rapport à la quantité totale de silicium Si déterminée par RMN avant calcination. Stand. : correspond à la synthèse effectuée dans les conditions « standards ».

Les particules synthétisées sous flux de N_2 ont perdu toute organisation structurale après 24 heures de vieillissement en milieu aqueux. Ceci est caractérisé par un tassement du diffractogramme et de l'isotherme ainsi qu'une diminution du volume poreux de 84% et de la surface spécifique de 43%. Pour les particules synthétisées suivant le protocole de Cai *et al.*, la déstructuration du matériau est moins marquée puisque le pic de réflexion (100) apparaît toujours sur le diffractogramme même si sa largeur a augmenté. De plus, la marche de remplissage caractéristique de la mésoporosité est toujours présente sur l'isotherme mais pour des pressions relatives plus faibles. Le volume poreux et la surface spécifique ont diminué de 59% et 23%, respectivement. Ces résultats tendent à montrer que la déstructuration concerne seulement une partie des nanoparticules.

Les clichés de microscopie corroborent ces résultats. Après 24 heures dans l'eau, l'arrangement hexagonal est toujours présent sur certaines nanoparticules issues de la méthode « standard », tandis qu'il a complètement disparu sur toutes les particules issues de la synthèse réalisée sous flux de N_2 .

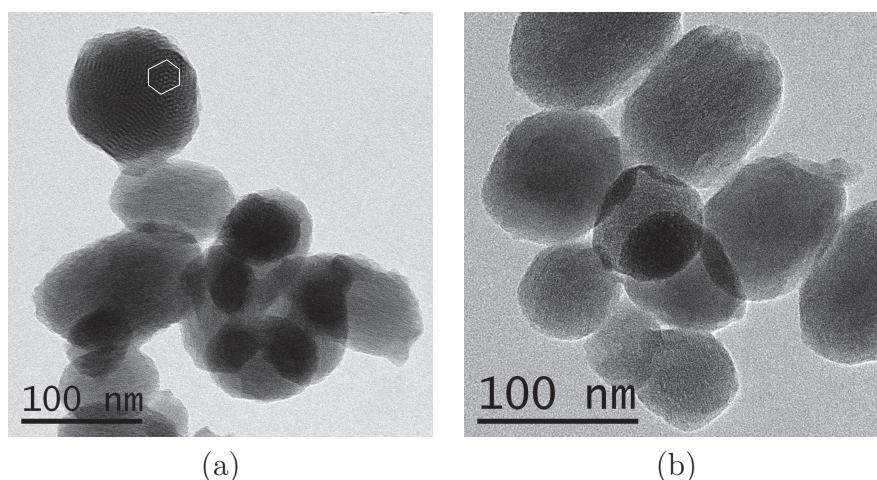


FIGURE 2.35 : Clichés MET des MSNs après 24 heures dans l'eau pour les échantillons synthétisés dans les conditions « standards » (a) ou pour l'échantillon synthétisé sous N_2 (b).

Igarashi *et al.* ont démontré que la stabilité des mésoporeux pouvait être directement corrélée au rapport $SiOH/e$ (défini dans le Tableau 2.13) qui est directement lié au taux de condensation D_{cond} [162]. Ils ont démontré que plus ce rapport augmentait, plus la perte de la mésostructure était importante. Les résultats que nous obtenons vont dans ce sens puisque le rapport $SiOH/e$ est supérieur pour la synthèse réalisée sous flux de N_2 , c'est-à-dire là où la déstructuration est la plus remarquable. Ainsi, il convient de trouver une méthode qui permet de renforcer suffisamment la structure des particules obtenues en utilisant un flux de N_2 tout en préservant leur stabilité colloïdale après synthèse.

2.2.9 Renforcement structural des MSNs

Dans la littérature, de nombreuses méthodes sont proposées pour renforcer la structure des matériaux de type MCM-41. Par exemple, il est possible de modifier les paramètres de synthèse

comme la température [411], la longueur de la chaîne alkyle [411] ou le pH [355, 412] mais aussi de rajouter des sels inorganiques en solution [385, 407, 413, 414], des agents minéralisants [415] ou encore d'utiliser des traitements hydrothermaux post-synthèse [356]. Toutes ces méthodes affectent les propriétés structurales du matériau comme la taille du mur de silice [416], le degré de condensation de la silice [356] ou la taille des pores [417].

D'autres méthodes consistent à introduire à la surface de la silice des groupements hydrophobes comme des groupements triméthyles qui limitent les interactions de la silice avec l'eau et donc sa solubilisation [418]. D'autres groupements organiques comme les thiols peuvent être aussi utilisés [419]. Les groupements amines favorisent quant à eux cette solubilisation à cause de leur forte basicité, imposant un pH local élevé en surface des canaux [420].

2.2.9.1 Démarche expérimentale de renforcement structural

Dans le but de renforcer la structure silicique des particules synthétisées sous flux de N_2 , quatre tests sont réalisés. Ils sont résumés sur la Figure 2.36.

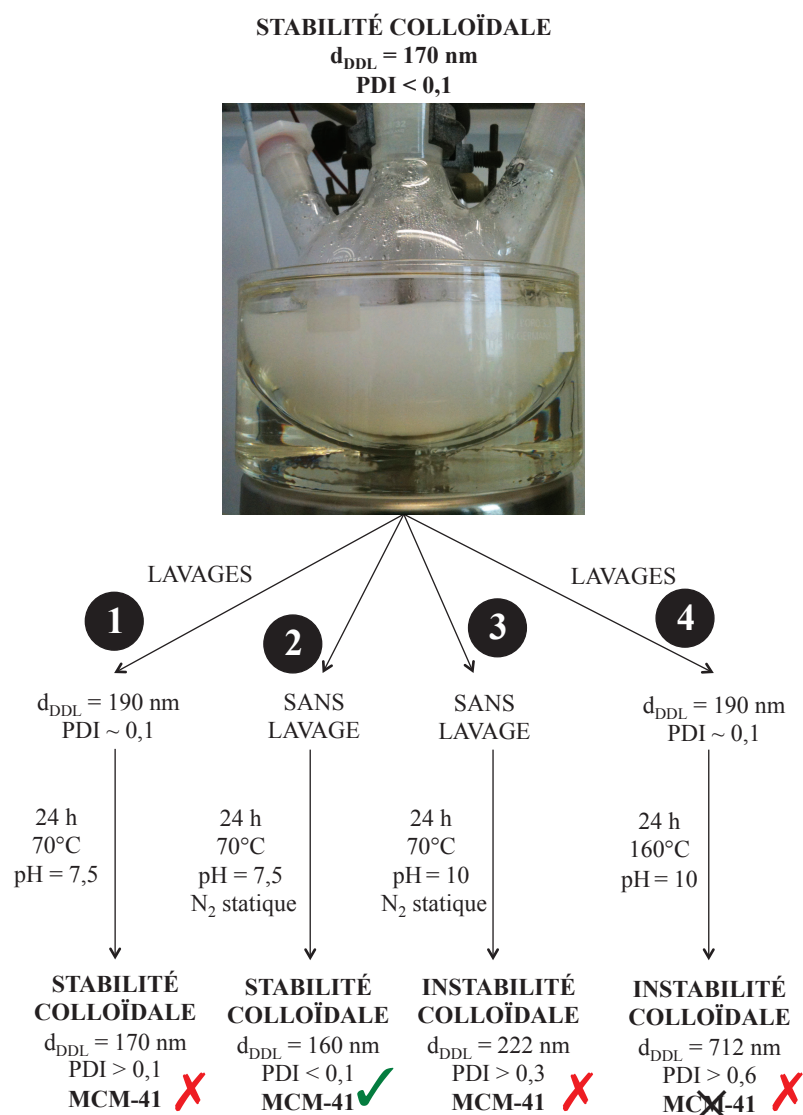


FIGURE 2.36 : Démarches expérimentales utilisées pour renforcer la structure des MSNs.

2.2. Stabilité colloïdale et structurale des MSNs

Le test ❶ implique des centrifugations après synthèse puis une redispersion des MSNs dans l'eau avec ajustement goutte à goutte du pH à 7,5 (pH pour lequel la vitesse de condensation est maximale) avec une solution de HCl à 1 M. La réaction est ensuite maintenue dans ces conditions pendant 24 heures. Le test ❷ n'implique pas de lavages mais un ajustement du pH du milieu de synthèse à 7,5 avec une solution de HCl à 1 M (2,1 mL). La réaction est ensuite laissée pendant 24 heures sous agitation et sous N₂ statique. Pour le test ❸, la réaction est prolongée pendant 24 heures sous N₂ statique sans aucune modification du pH. Le dernier test ❹ implique des lavages, une redispersion dans l'eau puis un traitement hydrothermal à 160 °C pendant 24 heures. Pour les quatre tests réalisés, la Figure 2.36 présente les diamètres hydrodynamiques des particules, la stabilité des suspensions, les PDIs ainsi que les structures obtenues.

Au vu des résultats obtenus, la méthode ❷ est la seule qui permet d'obtenir des MSNs de type MCM-41 tout en préservant la stabilité colloïdale après synthèse. Par la suite, nous étudierons en détails les propriétés morphologiques et structurales de ces particules ainsi que leur stabilité en milieu aqueux.

2.2.9.2 Propriétés morphologiques et structurales des MSNs après renforcement de la structure silicique

Les propriétés morphologies, structurales et texturales des MSNs synthétisées sous flux de N₂ avec et sans renforcement à pH = 7,5 pendant 24 heures sont comparées dans le Tableau 2.14. Les isothermes de sorption de N₂ et les diffractogrammes des MSNs calcinées des deux échantillons sont présentés sur la Figure 2.38. Les spectres RMN ²⁹Si MAS en simple impulsion sont indiqués sur la Figure 2.37.

TABLEAU 2.14 : *Propriétés physico-chimiques des MSNs synthétisées sous flux de N₂ avec ou sans renforcement (Renf. ou Ss renf., respectivement) à pH = 7,5 pendant 24 heures ou dans les conditions « standards » (Std.). Les tailles d_{DDL} et d_{MET} sont données après synthèse.*

Cond.	d _{DDL} (nm) (PDI)	d _{MET} (nm) (c _v)	d ^a (nm)	D _{cond}	P _{cont} (%)	S _{BET} (m ² /g)	V _m (cm ³ /g)	D _p (nm)	SiO ₂ /CTA ⁺ (mol/mol)	η (%)
Ss renf.	167 (0,04)	135 (0,22)	3,54	0,7	10	1310	0,98	2,4	3,9	45
Renf.	158 (0,08)	149 (0,29)	3,88	1,4	5	1075	0,90	2,7	6,8	60
Std.	228 (0,22)	122 (0,17)	3,85	1,3	6	1075	0,95	2,9	7,1	75

^ad : distance de corrélation du pic (100) déterminée après calcination.

Pour les deux échantillons, les spectres RMN ²⁹Si présentent les trois résonances Q⁴ (-110 ppm), Q³ (-100 ppm) et Q² (-90 ppm), caractéristiques du réseau silicique. Les déconvolutions des spectres montrent que les pourcentages des espèces Q⁴, Q³ et Q² valent respectivement à 42, 49 et 9% pour l'échantillon non-renforcé, et 58, 36 et 6% pour l'échantillon renforcé. Au regard

de la proportion des espèces Q^4 et Q^3 , la structure silicique de l'échantillon renforcé est donc beaucoup mieux condensée, ce qui est corroboré par une augmentation du taux de condensation (D_{cond}) de 0,7 à 1,4 (Tableau 2.14). Le taux de contraction corrobore ces résultats puisqu'il diminue et passe de 10% à 5%. De telles évolutions ont été observées par Ryoo *et al.* dans le cadre du renforcement de matériaux de type MCM-41 par ajustement du pH [355].

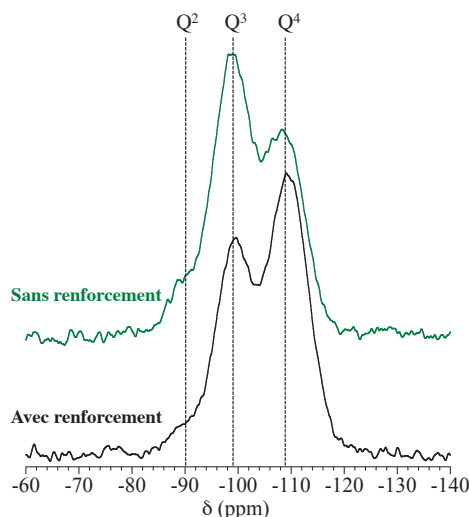


FIGURE 2.37 : Spectres RMN ^{29}Si MAS en simple impulsion des MSNs synthétisées sous flux de N_2 avec ou sans renforcement.

Avec le renforcement, les diffractogrammes montrent que l'arrangement hexagonal est mieux défini car les pics de réflexions (100), (110), (200) et (210) sont plus intenses. La distance de corrélation du pic (100) a augmenté et est passée de 3,54 à 3,88 nm (Tableau 2.14). Une évolution similaire a également été observée par Ryoo *et al.* [355]. La distribution en taille des pores avec le renforcement est plus étroite, la taille des pores a augmenté de 2,4 à 2,7 nm, tandis que la surface spécifique et le volume poreux ont diminué de 1310 à 1075 m^2/g , et 0,98 à 0,90 cm^3/g , respectivement. L'épaisseur du mur de silice n'a pas évolué et reste égale à environ 1,8 nm.

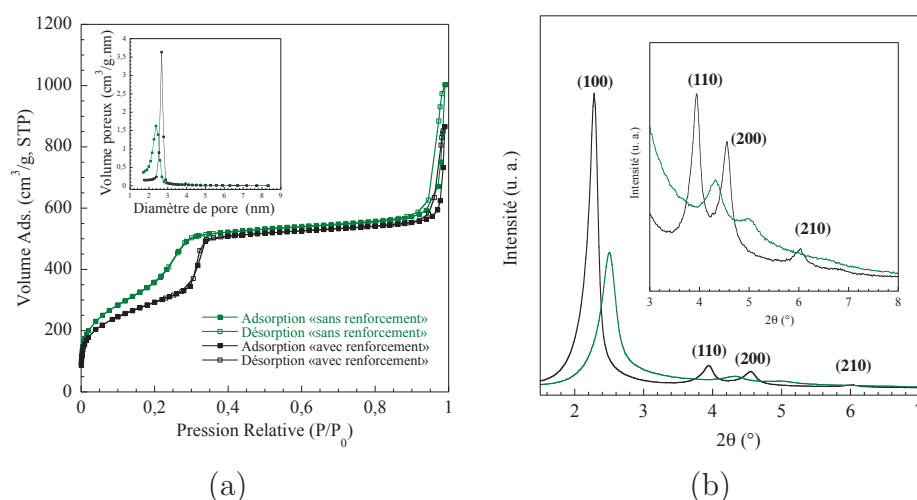


FIGURE 2.38 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés avec renforcement (courbes noires) ou sans renforcement (courbes vertes).

Le diamètre d_{DDL} avec le renforcement diminue de 167 à 158 nm, tandis que la taille d_{MET} reste quasiment constante (Tableau 2.14). Après renforcement, le rapport SiO_2/CTA^+ augmente de 3,9 à 6,8 (mol/mol). Ceci pourrait indiquer que le tensioactif a été « expulsé » du matériau par diminution de la densité de groupements silanols après formation des liaisons siloxanes par condensation à pH 7,5 [205, 413]. Enfin, le rendement augmente de façon significative et passe de 45% à 60%. Avec la diminution du pH, la solubilité de la silice diminue (voir section 1.1.3), ce qui mène à sa précipitation. Cependant, dans ces conditions de pH, il est peu probable que la formation de nanoparticules mésoporeuses de silice puisse avoir lieu. Ainsi, l'augmentation du rendement avec le renforcement est probablement due à la diffusion des espèces siliciques présentes en solution à travers les canaux. Pour confirmer cette hypothèse, il conviendrait de mesurer la concentration en silicium présent en solution en fonction du temps lors du renforcement.

Pour conclure, le renforcement de la structure silicique par abaissement du pH à 7,5 suivi d'un vieillissement pendant 24 heures a permis d'obtenir des nanoparticules dont les propriétés structurales et texturales sont proches de celles synthétisées dans les conditions « standards » (Tableau 2.14). De plus, cette méthode de renforcement permet de préserver la stabilité colloïdale acquise lorsque la synthèse est réalisée sous flux de N_2 .

2.2.10 Stabilité structurale en milieu aqueux des MSNs synthétisées avec un flux de N_2 et renforcées à pH 7,5

La stabilité structurale en milieu aqueux des particules issues de la synthèse renforcée a aussi été étudiée. La Figure 2.39 présente l'isotherme de sorption de N_2 et le diagramme de diffraction des particules avant et après vieillissement pendant 24 heures dans l'eau. Les propriétés physico-chimiques sont reportées dans le Tableau 2.15. Les clichés de microscopie des MSNs renforcées après extraction et après 24 heures dans l'eau sont présentés sur la Figure 2.40.

TABLEAU 2.15 : Récapitulatif des propriétés structurales des MSNs renforcées après extraction (Ext.) et après 24 heures de vieillissement dans l'eau (Ext. 24 h). L'extraction du tensioactif a été réalisée en utilisant la méthode au nitrate d'ammonium (voir paragraphe 2.1.5.4).

Cond. exp.	d^a (nm)	e^b (nm)	S_{BET} (m^2/g)	V_m (cm^3/g)	D_p (nm)
Ext.	4,19	2,0	1056	0,95	2,8
Ext. 24 h	4,07	1,9	747	0,62	2,8

^a d : Distance de corrélation du pic (100) ; ^b e : Taille du mur de silice $e = 2d_{100}/\sqrt{3} - D_p$.

Après 24 heures en milieu aqueux, le volume poreux diminue de 35% et la surface spécifique de 29% (Tableau 2.15). Le diffractogramme présente toujours les pics de réflexion caractéristiques de l'arrangement hexagonal 2D mais ceux-ci sont plus larges et moins intenses. Les clichés de microscopie de la Figure 2.40 corroborent ces résultats puisqu'ils montrent des particules aussi bien mésostructurées que déstructurées.

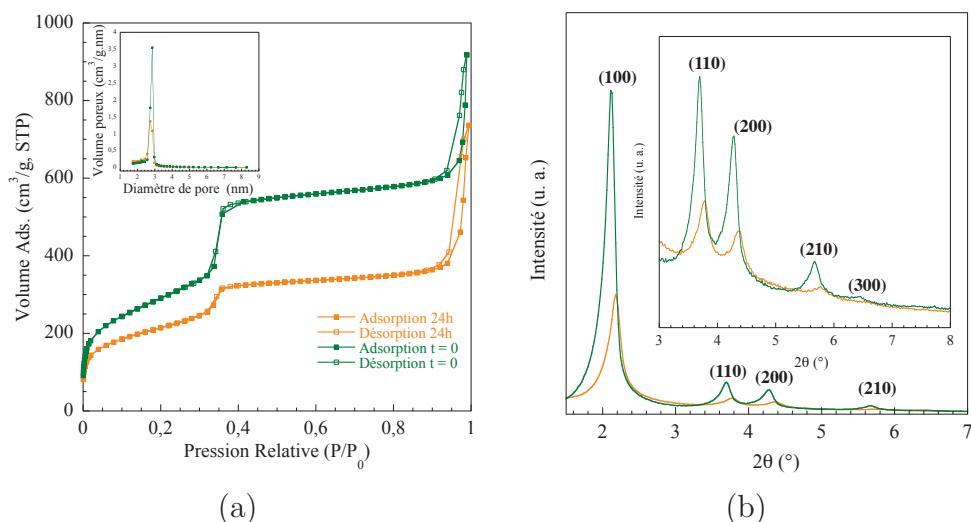


FIGURE 2.39 : (a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés sous flux de N_2 pendant 2 heures suivi d'un « renforcement » de 24 heures à $pH = 7,5$ et après extraction au nitrate d'ammonium ($4^*NH_4NO_3$). En vert : directement après extraction. En orange : après 24 heures de vieillissement dans l'eau.

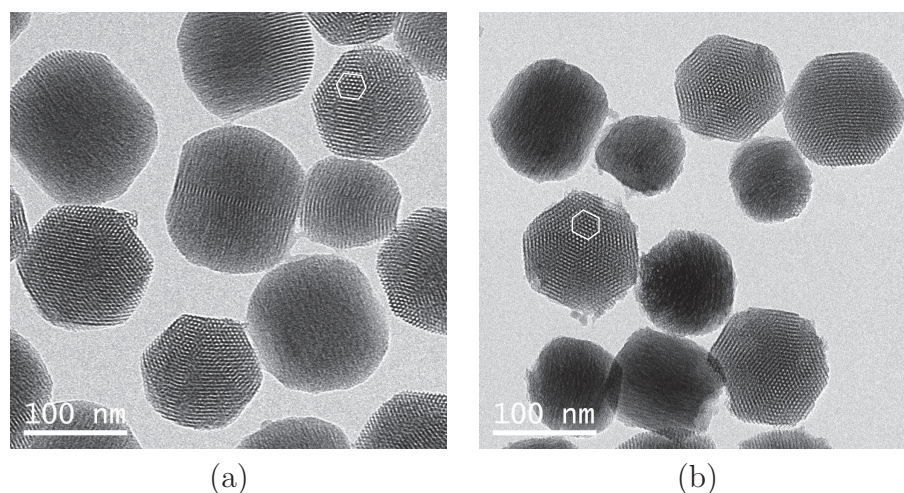


FIGURE 2.40 : Clichés MET des MSNs renforcées (a) après extraction et (b) après 24 heures dans l'eau.

En ajustant le pH de synthèse après 2 heures de réaction, la structure silicique des particules a été renforcée. Ceci est confirmé par une diminution de seulement 35% du volume poreux après 24 heures de vieillissement en milieu aqueux. Pour la synthèse « standard » et sous N_2 , nous avons montré que les volumes poreux avaient diminué de 59% et 84%, respectivement. Avec le renforcement, il y a donc une amélioration significative de la stabilité structurale en milieu aqueux.

2.2.11 Dispersion des MSNs après extraction

Dans les parties précédentes, nous avons montré qu'une suspension colloïdale stable de MSNs après synthèse pouvait être obtenue en travaillant sous flux de N_2 , contrairement à ce que l'on pouvait obtenir en utilisant les conditions « standards » établi par Cai *et al.* Par contre, nous

n'avons pas encore démontré que la dispersion des nanoparticules après extraction avait été améliorée notamment grâce à la disparition des ponts entre les particules. Pour ce faire, les diamètres hydrodynamiques des deux types de particules ont été mesurés en les redispersant aux ultrasons dans une solution de NaCl à 10^{-3} M et à une concentration de 1 mg/mL. Les résultats sont reportés sur la Figure 2.41. L'état de dispersion a également été caractérisé par microscopie électronique (Figure 2.42).

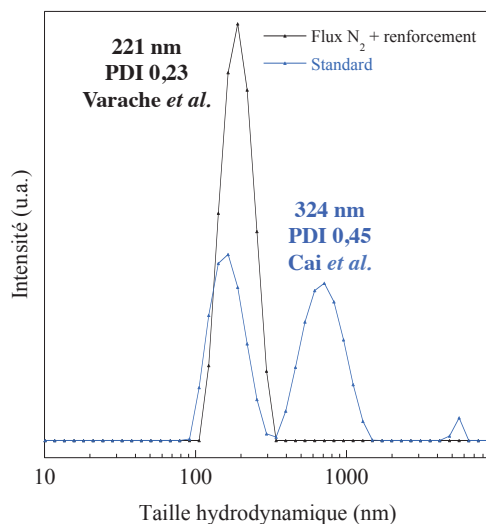


FIGURE 2.41 : *Diamètres hydrodynamiques des MSNs après extraction. Sel de fond NaCl = 10^{-3} M, $[MSNs] = 1$ mg/mL et pH = 7.*

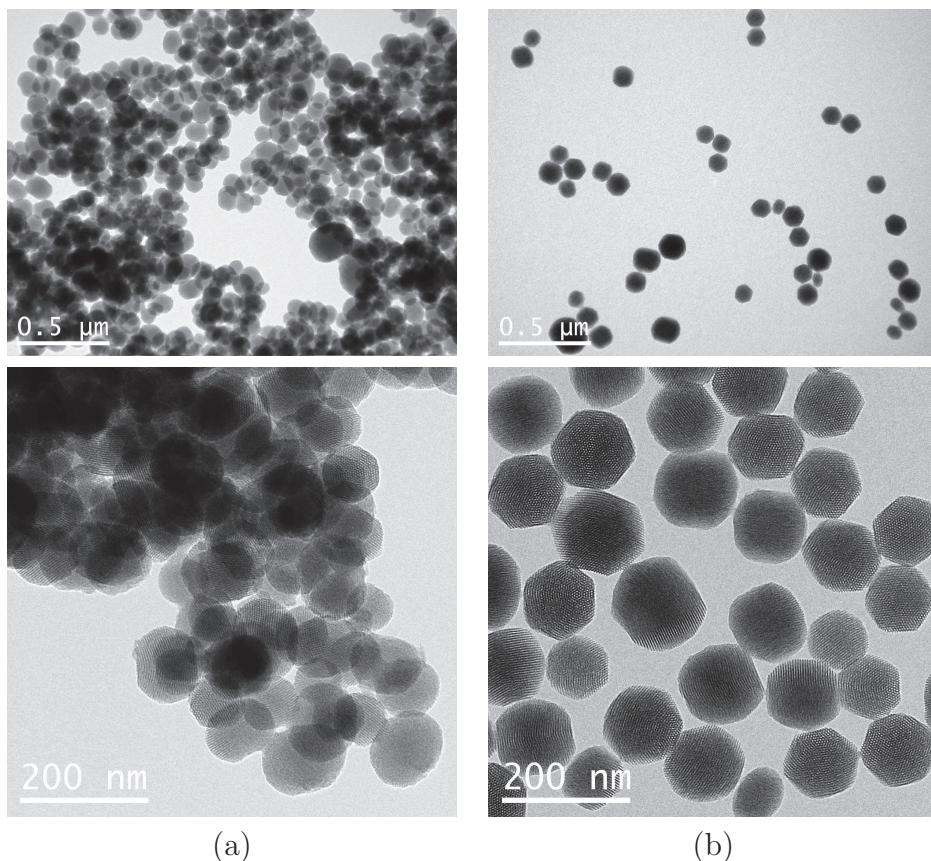


FIGURE 2.42 : *Clichés MET après extraction des échantillons (a) issu de la méthode « standard », (b) issu de la synthèse réalisée sous flux de N_2 et renforcée.*

Pour la synthèse utilisant le protocole de Cai *et al.*, la diffusion de la lumière montre trois populations et une taille moyenne de 324 nm avec un PDI de 0,45. La première population, centrée à 160 nm, est probablement celle des particules individuelles. La deuxième population, centrée à 715 nm, représente plutôt des agrégats constitués de quatre à cinq particules. La troisième population, centrée à 5,5 μm , est représentative de très gros agrégats. Pour notre synthèse, une seule population est visible et est centrée à 221 nm avec un PDI de 0,23. Les clichés de microscopie de la Figure 2.42 corroborent ces résultats puisque de gros agrégats sont clairement visibles pour la synthèse de Cai *et al.* tandis que des particules très bien dispersées sont observées pour notre synthèse. Néanmoins, il convient de préciser qu'après l'extraction, quelques agrégats sont présents en suspension pour la synthèse réalisée dans nos conditions. En effet, l'indice de polydispersité passe de 0,08 à 0,23 lorsque la mesure de taille est réalisée après la synthèse et après l'extraction, respectivement.

Note : les particules synthétisées suivant notre méthode seront dénommées dans la suite du manuscrit MSNs_{ext} et correspondront à la méthode de synthèse de « référence ».

2.3 Comportement des MSNs en présence de cellules en culture

L'objectif de ces manipulations était double : tester l'innocuité des MSNs synthétisées vis-à-vis des cellules en culture, et démontrer la nécessité d'extraire totalement le tensioactif des canaux.

2.3.1 Conditions de culture cellulaire

Les tests biologiques ont été réalisés sur la lignée de cellules cancéreuses de côlon humain SW480, qui sont des cellules adhérentes.

Les cellules sont cultivées en incubateurs à une température de 37 °C sous 5% de CO_2 dans du milieu de culture RPMI 1640 (BioWhittaker, France) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal (BioWhittaker, France). Ce milieu complexe sera appelé par la suite Milieu Nutritif Complet (MNC).

2.3.2 Préparation des échantillons

Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur deux types de MSNs :

- MSNs non extraites ($\text{MSNs}_{\text{non-ext}}$) possédant 34,5% (m/m) de CTA^+ (déterminé par ATG)
- MSNs extraites (MSNs_{ext})

Une préparation mère de nanoparticules à une concentration de 4 mg/mL a été réalisée dans une solution de NaCl à 10^{-3} M. Afin de disperser les particules, les suspensions ont été placées

2.3. Comportement des MSNs en présence de cellules en culture

10 minutes au bain à ultrasons puis 10 secondes à la canne à ultrasons à 70% d'amplitude.

Les tests de cytotoxicité sont aussi réalisés sur le CTAB à partir d'une solution mère à 4 mM préparée dans du NaCl à 0,15 M (sérum physiologique).

Les solutions de NaCl à 10^{-3} et 0,15 M ayant aussi subi le même protocole de sonication ont également été étudiées.

2.3.3 Test de cytotoxicité

Les cellules cancéreuses SW480 sont implantées dans des plaques 96 puits à une densité de 20 000 cellules par puits, ce qui permet d'obtenir un état proche de la confluence. Puis, elles sont placées à l'étuve pendant deux jours, pour assurer l'adhésion des cellules au support. Ensuite, le milieu de culture est enlevé, et les cellules sont traitées en triplicate par les échantillons préparés. Les différents types de MSNs sont testés à des concentrations croissantes de 0 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$; et le tensioactif CTAB à des concentrations de 0 - 3,125 - 6,25 - 12,5 et 25 μM . Trois séries de manipulations ont été effectuées à une semaine d'intervalle. Après 72 heures de traitement, deux conditions sont testées :

- soit la culture cellulaire est stoppée immédiatement, ce qui correspond à une étude à court terme,
- soit le milieu de culture contenant les MSNs est enlevé puis remplacé par du MNC. La culture cellulaire est poursuivie pendant 3 jours supplémentaires, ce qui correspond à une étude à long terme où les processus de mort cellulaire plus tardifs sont également appréciés.

2.3.4 Coloration au crystal violet

A l'arrêt de la culture cellulaire, les cellules sont rincées avec une solution de DPBS (Dubecco's Phosphate Buffered Saline), puis fixées à l'éthanol pur, et colorées par du crystal violet à 1% (m/v) qui va pénétrer dans les cellules vivantes au fond des puits. L'excès de colorant est lavé à l'eau, et les plaques 96 puits sont laissées à sécher à l'air. Puis, le crystal violet est remis en suspension dans de l'acide acétique à 33% (m/v). L'intensité de coloration dans chaque puits est appréciée par la mesure de la densité optique par spectrophotométrie dans le visible à 570 nm. La Densité Optique (DO) est proportionnelle au nombre de cellules présentes dans chaque puits.

2.3.5 Expression des résultats

Les résultats sont présentés :

- soit sous forme de viabilité cellulaire calculée de la manière suivante : pour chaque puits, la valeur de DO mesurée est divisée par la valeur de DO témoin ; la valeur du rapport est ensuite présentée sous forme de pourcentage selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Viabilité cellulaire} = \frac{(DO)_{\text{puits}}}{(DO)_{\text{témoin}}} \times 100 \quad (2.10)$$

- soit sous forme de cytotoxicité calculée de la manière suivante : pour chaque puits, la valeur de DO mesurée est retranchée à la valeur de DO du témoin ; cette différence est ensuite divisée par la valeur de DO du témoin et la valeur du rapport est présentée sous forme de pourcentage selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Cytotoxicité} = \frac{(DO)_{\text{témoin}} - (DO)_{\text{puits}}}{(DO)_{\text{témoin}}} \times 100 \quad (2.11)$$

2.3.6 Résultats et Discussion

Les viabilités cellulaires des cellules SW480 en fonction de la concentration en MSNs, pour les deux conditions de temps et pour les deux types de nanoparticules sont données sur la Figure 2.43(a). La cytotoxicité du CTAB en fonction de la concentration pour les deux conditions de temps est donnée sur la Figure 2.43(b).

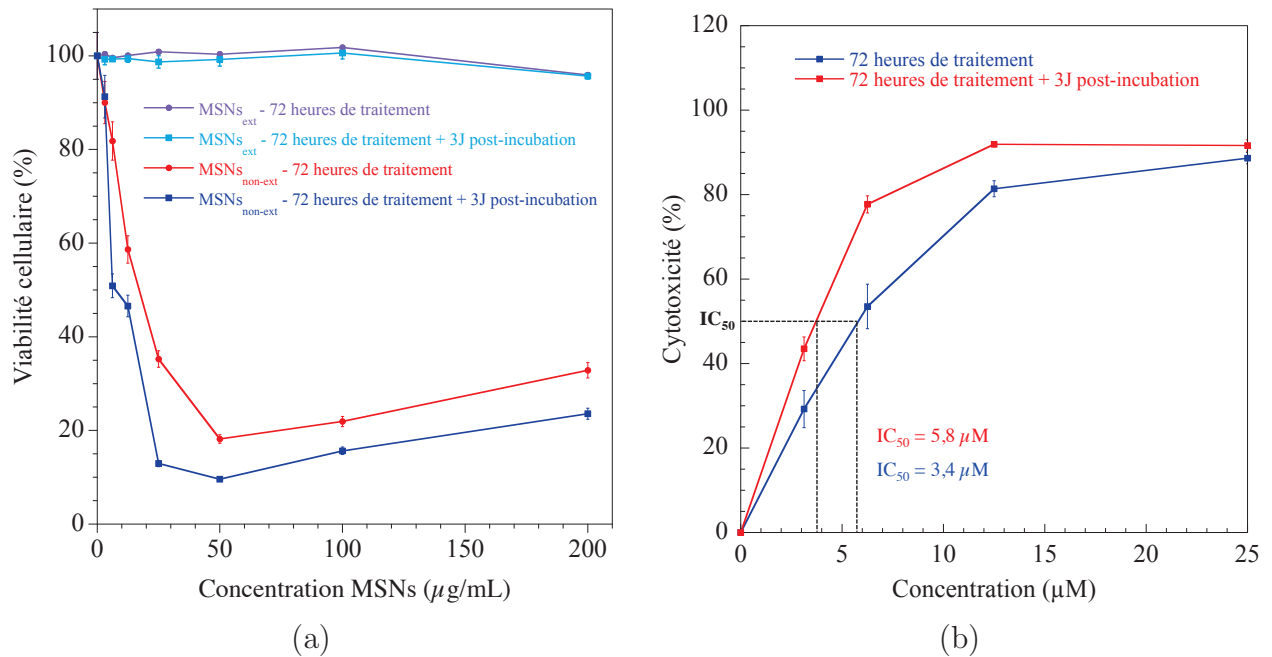


FIGURE 2.43 : Viabilité cellulaire des MSNs extraites et non extraites (a) et cytotoxicité du CTAB (b) sur des cellules cancéreuses de côlon humain SW480. La révélation est effectuée soit directement après 72 heures de traitement, soit après 3 jours de post-incubation supplémentaires.

Les nanoparticules non extraites exercent une activité cytotoxique vis-à-vis des cellules SW480, et ce, dès la plus faible concentration de 3,125 μg/mL où la viabilité cellulaire a déjà diminué de 10%. A partir de 25 μg/mL, la viabilité cellulaire diminue fortement (elle n'est plus que de 20 à 30%) et le phénomène est aggravé lorsque 3 jours de post-incubation sont réalisés, suggérant un effet cytotoxique qui continue à évoluer dans les jours qui suivent le traitement.

Cette forte cytotoxicité est directement corrélée à la présence du CTA⁺ dans les particules

mésoporeuses [421]. En effet, nous avons déterminé que la quantité de CTA^+ restant à l'intérieur des MSNs non extraites était égale à 34,5% (m/m), soit une concentration résiduelle de CTAB égale à 243 μM , lorsque les cellules sont incubées à une concentration de MSNs de 200 $\mu\text{g/mL}$. Or, les courbes de cytotoxicité du CTAB seul montrent qu'à la plus forte concentration testée de 200 μM , la cytotoxicité est de 75% après 72 heures de traitement et 77% après 3 jours de post-incubation supplémentaires. Cette cytotoxicité importante du CTAB seul est représentative de la cytotoxicité des MSNs non extraites à 200 $\mu\text{g/mL}$ (viabilités égales à 33% après 72 heures et 24% après 3 jours de post-incubation). De plus, la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) du CTAB est très faible. Elle est égale à 3,4 μM après 72 heures de traitement et 5,8 μM après 3 jours de post-incubation supplémentaires. Il est donc nécessaire d'éliminer la totalité du CTA^+ afin d'éviter tout effet cytotoxique potentiel.

Les nanoparticules extraites n'induisent pas de cytotoxicité, et ce, quels que soient le temps de traitement et les concentrations utilisées. Les viabilités cellulaires sont toutes proches de 100%. Prolonger la culture cellulaire de 3 jours, n'a pas d'influence sur la viabilité cellulaire, démontrant ainsi que les MSNs n'induisent pas de mortalité retardée.

Pour finir, les solutions de NaCl à 10^{-3} et 0,15 M ayant subi le même protocole de sonication ne présentent pas de cytotoxicité vis-à-vis des cellules, confirmant l'absence d'effet cytotoxique de la solution aqueuse (données non montrées).

2.4 Conclusion sur la synthèse et la cytotoxicité des MSNs

Dans ce chapitre, une étude paramétrique des conditions opératoires de synthèse a été présentée. Les facteurs expérimentaux tels que la concentration en soude, la vitesse d'agitation, la température ont une grande influence aussi bien sur les propriétés morphologiques que structurales et texturales :

- seules des concentrations en soude comprises entre 12,5 mM et 25 mM permettent d'obtenir des nanoparticules méoporeuses de silice de type MCM-41. Dans cette gamme étroite, la taille des particules peut être contrôlée de 80 à 600 nm tandis que la surface spécifique et le volume poreux n'évoluent pas et valent respectivement 1100 m^2/g et 1,0 cm^3/g . En revanche, le diamètre des pores diminue de 3,3 à 2,2 nm lorsque la concentration en soude passe de 5,0 à 27,5 mM. En dessous d'une concentration de 12,5 mM, les matériaux obtenus correspondent à un gel constitué d'agrégats mésoporeux dont la structure est désordonnée (vermiculaire). A la plus faible concentration (5 mM), ce gel mésoporeux possède un volume poreux total très élevé et égal à 2,7 cm^3/g . Au-dessus d'une concentration de 25 mM, les matériaux obtenus correspondent à des particules submicroniques super-microporeuses dont le taux de condensation est faible et la surface spécifique élevée (1475 m^2/g à la concentration de 27,5 mM).

- la vitesse d'agitation doit être contrôlée précisément puisqu'en dessous d'une valeur seuil, la synthèse de nanoparticules sphériques de type MCM-41 n'est plus assurée.
- la température de synthèse ne doit pas dépasser 90 °C, sinon une perte de qualité de la structure MCM-41 est observée.

Afin de libérer la porosité et d'éviter les problèmes de cytotoxicité intrinsèques du CTAB, l'extraction du tensioactif par voie chimique a été optimisée. Une méthode simple, rapide et sensible permettant la vérification de l'efficacité de l'extraction a été mise au point en utilisant la spectroscopie Raman.

Dans ce chapitre, nous avons également montré que l'humidité de l'air avait une grande influence sur les propriétés structurales et texturales des MSNs à long terme. Pour des applications futures, il convient de conserver les MSNs à l'abri de l'humidité de l'air si l'on souhaite garder intacte leurs propriétés structurales et texturales.

L'effet de la lyophilisation avant et après extraction a été également étudié. Seule la lyophilisation avant extraction permet de conserver les propriétés structurales et texturales des MSNs. Cette méthode peut être avantageuse dès lors que la fonctionnalisation de la surface externe des MSNs est envisagée et qu'elle a lieu dans un solvant anhydre.

Pour finir, nous avons démontré que la présence de carbonate et d'éthanol avait une grande influence sur la formation d'agrégats de particules pendant la synthèse. En contrôlant l'atmosphère de synthèse (travail sous flux de N₂), nous avons obtenu une suspension de MSNs stable d'un point de vue colloïdal après synthèse. De plus, il a été démontré que la structure silicique de ces nanoparticules pouvait être renforcée en utilisant une étape de vieillissement à pH 7,5 pendant 24 heures.

Le respect de l'ensemble de ces conditions d'expérience sont des pré-requis indispensables à toute utilisation future des MSNs en milieu biologique. Le contrôle des conditions d'extraction a constitué une étape clé puisque les MSNs extraites sont dépourvues de cytotoxicité vis-à-vis des cellules en culture, et ce, même lorsqu'elles sont utilisées à des concentrations aussi élevées que 200 µg/mL.

Chapitre 3

Synthèse, cytotoxicité *in vitro* et internalisation des nanoparticules mésoporeuses de silice fonctionnalisées

Pour que les nanoparticules mésoporeuses de silice soient utilisées comme nanovecteurs pour le cisplatine, il convient de contrôler la cinétique de libération de l'anticancéreux mais également d'optimiser son taux d'encapsulation. Ces facteurs sont liés aux interactions physico-chimiques entre la matrice (les nanoparticules) et la substance active. Par conséquent, la première partie de ce chapitre est consacrée à la modulation de la chimie de surface des nanoparticules en introduisant différentes fonctions organiques par **co-condensation** d'organosilanes. Par ailleurs, les nanoparticules doivent être stables dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire dans un milieu qui présente une force ionique élevée. Dans ce cadre, il a été envisagé de fonctionnaliser la surface externe des nanoparticules par greffage **post-synthèse** soit d'un polyélectrolyte, soit d'un polymère neutre. L'étude correspondante fait l'objet de la deuxième partie de ce chapitre. Avant d'envisager l'encapsulation du cisplatine dans ces différentes nanoparticules fonctionnalisées, il convient de tester leur innocuité vis-à-vis des cellules en culture, et de déterminer leur capacité à être invaginées par celles-ci. Pour ce faire, la cytotoxicité *in vitro* de ces nano-objets est évaluée et leur internalisation étudiée par microscopie confocale après fonctionnalisation des nanoparticules par une molécule fluorescente, la rhodamine. Ces études sont présentées dans les deux dernières parties de ce chapitre.

3.1 Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

Afin d'introduire des fonctions carboxyliques, amines et thiols au sein des nanoparticules, la méthode de greffage par co-condensation a été choisie car elle permet, à faible taux de fonctionnalisation, la conservation de la mésostructure, une répartition plus homogène des

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

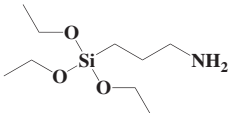
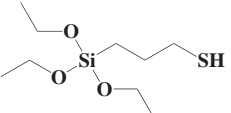
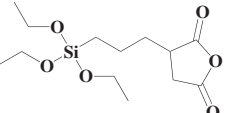
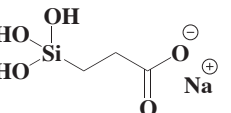
groupements organiques et une meilleure re-dispersabilité des particules, contrairement à la méthode de greffage post-synthèse. Deux méthodes de synthèse ont été utilisées. La première, basée sur le protocole mis au point dans le chapitre 2 (synthèse de « référence »), concerne l'introduction des fonctions carboxyliques, amines et thiols au sein des nanoparticules. La deuxième, basée sur les travaux de Gu *et al.* [342], concerne uniquement l'introduction de fonctions carboxyliques au sein des nanoparticules. Nous justifierons l'utilisation de ces deux méthodes lors de la présentation des résultats.

3.1.1 Protocoles de synthèse et choix des organosilanes

3.1.1.1 Réactifs utilisés

Les synthèses décrites ci-dessous ont nécessité les produits chimiques suivants : du tétraéthoxysilane $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS, $M_W = 208,33 \text{ g.mol}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH, CAS 78-10-4, 99%) comme source de silice, du bromure de cétyltriméthylammonium $(\text{C}_{16}\text{H}_{33})\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ (CTAB, $M_W = 364,45 \text{ g.mol}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH, CAS 57-09-0, 99%) comme tensioactif cationique et une solution d'hydroxide de sodium NaOH à 2M ($M_W = 40,00 \text{ g.mol}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH, CAS 1310-73-2, 7,3% (m/m), volumetric) comme catalyseur et du nitrate d'ammonium NH_4NO_3 ($M_W = 80,04 \text{ g.mol}^{-1}$, FISHER CHEMICALS, CAS 6484-52-2, 98%) et de l'acide chlorhydrique HCl ($M_W = 36,46 \text{ g.mol}^{-1}$, FISHER CHEMICALS, CAS 7647-01-0, 36-38%) pour l'extraction du tensioactif. Tous ces produits ont été utilisés sans purification supplémentaire. La synthèse et les étapes de purification ont demandé les solvants suivants : de l'eau ultra-pure (MilliQ, 18 $M\Omega\text{.cm}$) et de l'éthanol technique (95%). Les silanes secondaires utilisés sont résumés dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU 3.1 : Récapitulatif des silanes secondaires (Fluorochem, UK) utilisés pour la fonctionnalisation des différents types de MSNs.

Fonctionnalisation	$-\text{NH}_2$	$-\text{SH}$	$-\text{COOH}$	$-\text{COOH}$
Silane secondaire	APTES ^a	MPTES ^b	TESP ^c	CEST ^{*d}
Formule topologique				
Masse molaire (g/mol)	221,37	238,42	304,41	196,40 (25%)
Densité (g/cm ³)	0,948	0,932	1,07	1,17
Numéro CAS	919-30-2	14814-09-6	93642-68-3	18191-40-7

^{*} Silane utilisé dans la méthode de Gu *et al.* [342] : solution à 25% (m/m) dans l'eau. ^a APTES : (3-aminopropyl)triéthoxy-silane ; ^b MPTES : (3-mercaptopropyl)triéthoxy-silane ; ^c TESP : anhydride (3-triméthoxysilyl)propylsuccinic ; ^d CEST : carboxyéthylsilanetriol.

3.1.1.2 Adaptation du protocole de « référence » à la fonctionnalisation par co-condensation

Dans une procédure typique, 416,6 mg de CTAB (1,14 mmol) sont dissous dans 200 mL d'eau ultra-pure. Le mélange est ensuite placé dans un ballon quadricol à fond rond de 500 mL puis purgé trois fois avec de l'azote. Avant d'être porté sous agitation à 70 °C, 1,45 mL d'une solution « fraîche » de NaOH à 2 M (2,90 mmol) est ajouté au mélange. Le système est maintenu pendant deux heures à 70 °C sous un balayage de N₂ de 150 mL/min. A côté, le TEOS et le silane secondaire sont mélangés dans un tube de Schlenk sous balayage d'azote. Sauf exception, les quantités de silane secondaire sont égales à 10% molaire de la quantité de silane total (TEOS + silane secondaire = 8,99 mmol). Ces quantités sont indiquées dans le Tableau 3.2. Le mélange est ajouté à la solution de CTAB à une vitesse constante de 1 mL/min sous un balayage d'azote de 1 L/min.

TABLEAU 3.2 : *Récapitulatif des quantités de matière ajoutées lors de la fonctionnalisation par co-condensation des MSNs par des fonctions amines, thiols et carboxyliques. La quantité molaire de TESP est de 5% au lieu de 10% étant donné que la molécule possède deux fonctions carboxyliques pour un silane.*

Fonctionnalisation	$-NH_2$	$-SH$	$-COOH$
Silane secondaire	APTES	MPTES	TESP
% molaire	10	10	5
V_{TEOS} (μ L)	1809	1809	1910
V_{silane} (μ L)	210	230	128
Notation	MSNs-NH₂	MSNs-SH	MSNs-COOH_{rod}

Après 2 heures à 70 °C, le pH de la suspension est ajusté à 7,5 par ajout d'une solution d'HCl à 1 M. Après 24 heures, le précipité blanc obtenu est lavé à l'eau déminéralisée par centrifugation (24 652 g, 20 minutes). Les centrifugations sont poursuivies jusqu'à ce que la conductivité soit inférieure à 10 μ S/cm. L'eau est ensuite éliminée à 80 °C à l'évaporateur rotatif. Afin de parfaire l'évaporation mais aussi consolider la structure silicique des MSNs, la poudre est maintenue à 90 °C sous vide pendant 1 heure également *via* l'évaporateur rotatif.

Afin d'éliminer le CTAB contenu dans les pores des MCM-41, la méthode d'extraction au nitrate d'ammonium présentée dans le chapitre 2 est réalisée (voir section 2.1.5.4). Dans une procédure typique, 600 mg de poudre sont dispersés dans 100 mL d'éthanol contenant 2 g de nitrate d'ammonium NH₄NO₃. Cette suspension est ensuite chauffée à reflux à 90 °C pendant une heure à 600 rpm. Après une centrifugation à 12069 g pendant 10 minutes, le culot est récupéré et subit alors trois fois le même traitement. Après ces quatre extractions successives, la poudre est abondamment lavée à l'éthanol et le solvant est ensuite évaporé sous vide à température ambiante. Pour des caractérisations et applications ultérieures, la poudre est conservée en dessiccateur placé sous vide dynamique. Pour les particules impliquant des groupements thiols (MSNs-SH), une cinquième extraction en milieu acide est nécessaire (voir paragraphe 3.1.6.6) . Pour cela,

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

après la centrifugation de la 4^{ème} extraction au nitrate d'ammonium, le culot est redispersé dans une solution contenant 10 mL d'une solution d'HCl à 36-38% et 100 mL d'éthanol. Le mélange est ensuite placé à 90 °C pendant une heure à 600 rpm. Ensuite, les particules sont lavées à l'éthanol en réalisant plusieurs cycles de centrifugation/redispersion et le solvant évaporé sous vide à température ambiante.

3.1.1.3 Protocole de fonctionnalisation issu de la méthode de Gu *et al.*

Dans cette procédure inspirée des travaux de Gu *et al.* [342], 750 mg de CTAB sont dissous dans 350 mL d'eau ultrapure. Le mélange est ensuite placé sous une agitation de 700 rpm dans un ballon quadricol à fond rond de 500 mL chauffé par un bain d'huile à 55 °C. Après une heure de réaction, 542 μ L de CEST (10% (mol/mol) par rapport au TEOS) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 30 minutes, une solution de TEOS alcoolique (0,3 mL TEOS/5 mL EtOH technique) fraîchement préparée est ajoutée en une seule fois. Après 4 heures de réaction, une nouvelle solution de TEOS alcoolique contenant 1,5 mL de TEOS et 5 mL d'EtOH est additionnée au mélange. Après une heure, l'agitation est stoppée pour un temps de vieillissement de 24 heures. Les particules sont ensuite lavées à l'eau et à l'éthanol par centrifugation (24630 g, 45 minutes). Le tensioactif est ensuite extrait en utilisant la procédure déjà présentée précédemment (voir paragraphe 3.1.1.2). La notation utilisée pour cet échantillon est **MSNs-COOH_{sph}**.

3.1.2 Caractérisation morphologique des MSNs fonctionnalisées

Sur les Figures 3.1 et 3.2, les tailles hydrodynamiques DDL et les clichés MET des différentes nanoparticules fonctionnalisées sont présentés. Un récapitulatif des tailles MET et DDL est donné dans le Tableau 3.3.

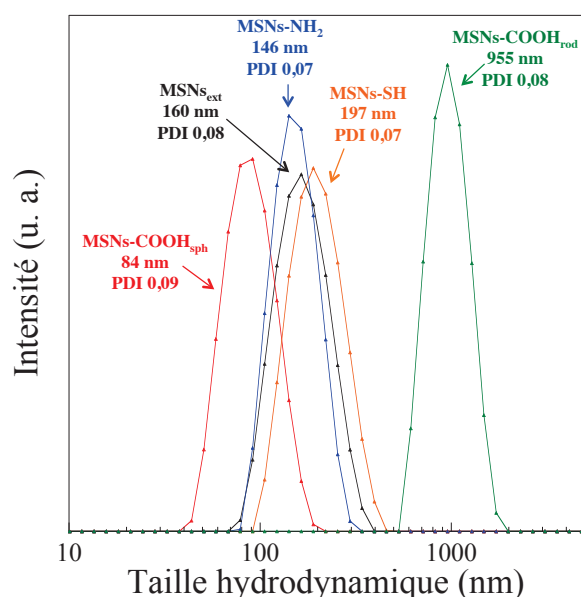


FIGURE 3.1 : Diamètres hydrodynamiques après synthèse des nanoparticules mésoporeuses de silice non fonctionnalisées $MSNs_{ext}$ (courbe noire), des $MSNs-NH_2$ (courbe bleue), des $MSNs-COOH_{sph}$ (courbe rouge), des $MSNs-SH$ (courbe orange) et des $MSNs-COOH_{rod}$ (courbe verte). Sel de fond : $NaCl\ 10^{-3}\ M$.

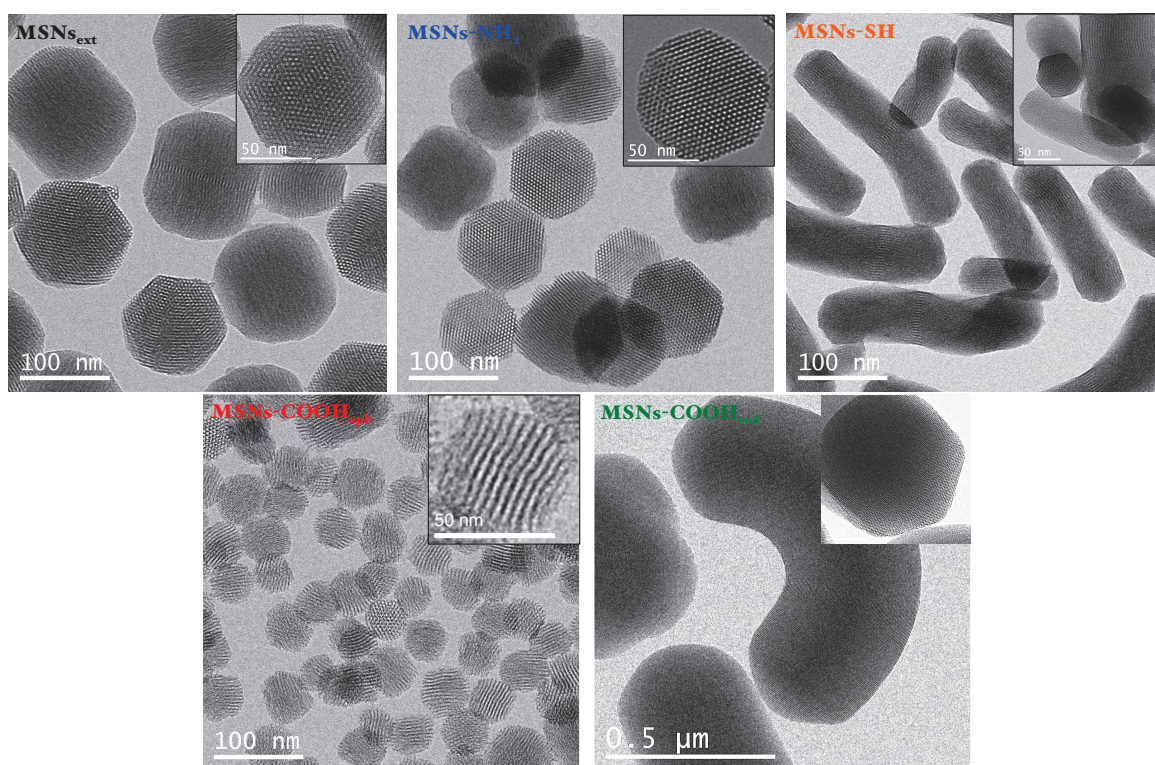


FIGURE 3.2 : Clichés MET après extraction des MSNs greffées par co-condensation.

TABLEAU 3.3 : Diamètres hydrodynamiques moyens obtenus après synthèse ($d_{DDL\ synth.}$) ou après extraction ($d_{DDL\ ext.}$) et diamètres obtenus par comptage MET ($d_{MET\ ext.}$) des MSNs fonctionnalisées après extraction.

Particules	MSNs _{ext}	MSNs-NH ₂	MSNs-SH	MSNs-COOH _{sph}	MSNs-COOH _{rod}
$d_{DDL\ synth.}$ (nm)	160	146	197	84	955
PDI	0,08	0,07	0,07	0,09	0,08
$d_{DDL\ ext.}$ (nm)	221	202	175	210	658
PDI	0,23	0,25	0,21	0,19	0,40
$d_{MET\ ext.}$ (nm)	130	120	70(L)/327(l)	77	494(L)/956(l)
c_v^a	0,20	0,14	0,21(L)/0,36(l)	0,35	0,10(L)/0,12(l)

^a c_v : Coefficient de variation. Pour les MSNs-SH et MSNs-COOH_{rod}, (L) et (l) représentent respectivement la largeur et la longueur de la particule.

Les MSNs-NH₂ sont de morphologie sphérique et présentent des canaux arrangés de manière hexagonale. Après synthèse, leur diamètre hydrodynamique moyen est plus faible que les particules non fonctionnalisées MSNs_{ext}. Après extraction, cette tendance est retrouvée. Les tailles MET de ces deux échantillons étant identiques, les MSNs-NH₂ sont donc mieux dispersées. Dans nos conditions de synthèse, l'introduction de l'APTES comme organosilane secondaire n'a donc pas eu d'effet sur la morphologie et la taille des particules. En fonction des conditions de synthèse (pH, concentration en organosilane, nature de la base), la littérature montre que la morphologie et la taille des nanoparticules fonctionnalisées par co-condensation avec l'APTES peuvent être ou non modifiées [295, 299, 422–424]. Par exemple, Trewyn *et al.* ont démontré que dans des conditions expérimentales proches des nôtres, l'introduction d'un organosilane

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

hydrophile comme l'APTES formait des particules dont la morphologie était proche de celles obtenues sans agent de co-condensation [299].

Les clichés MET des MSNs-SH montrent des objets dont la morphologie est en forme de bâtonnets dont la longueur l et la largeur L sont respectivement égales à 327 nm ($c_v = 0,36$) et 70 nm ($c_v = 0,21$). Ces nano-bâtonnets présentent des canaux parfaitement ordonnés et alignés parallèlement suivant l'axe de la longueur. Après synthèse et après extraction, les diamètres hydrodynamiques sont proches et valent respectivement 197 et 175 nm¹. Cette morphologie asymétrique a été observée pour la première fois par Sadasivan *et al.* [423]. Dans cette étude, les auteurs montrent que la longueur l et la largeur L des bâtonnets, dépendent du rapport molaire MPTES/TEOS. En présence de MPTES, les répulsions électrostatiques induites par la déprotonation des groupements thiolés à pH basique ($pK_a \sim 10$) ainsi que la formation des ponts disulfures provoquant une rigidité stérique du système, peuvent faciliter la croissance préférentielle des nanoparticules dans la direction parallèle aux canaux, contrairement à ce qu'il est proposé dans le cas de la co-condensation d'organosilanes neutres au pH de synthèse, comme l'APTES (Figure 3.3) [423].

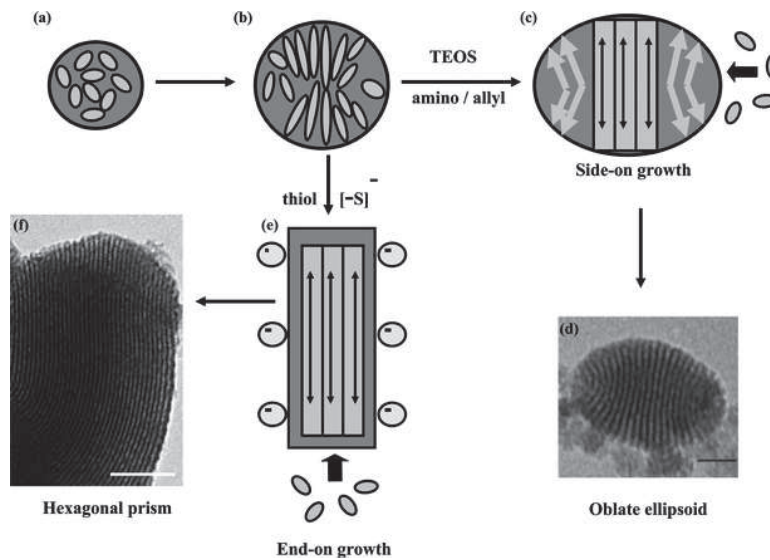


FIGURE 3.3 : Mécanisme de nucléation et croissance de particules fonctionnalisées de type MCM-41 proposé par Sadasivan *et al.* pour leur condition de synthèse. (a) agrégation des micelles hybrides, (b) transformation de phase, (c) co-condensation du TEOS/APTES, élancement du système tensioactif/silicate et croissance le long de la direction perpendiculaire aux canaux, (d) image MET d'une particule correspondant à (c), (e) co-condensation du TEOS/MPTES, élancement du système tensioactif/silicate et croissance le long de la direction parallèle aux canaux, (f) image MET d'une particule correspondant à (e). D'après [423].

Les particules MSNs-COOH_{sph} synthétisées *via* la méthode de Gu *et al.* ont une morphologie de type sphérique et les canaux sont de symétrie hexagonale bidimensionnelle. Après synthèse, leur diamètre hydrodynamique est inférieur à celui des MSNs_{ext} et est proche du diamètre obtenu par comptage MET. En revanche, les particules semblent être plus agrégées après extraction

1. Ces valeurs sont à prendre avec vigilance puisque le modèle utilisé pour le calcul du diamètre hydrodynamique considère des objets parfaitement sphériques.

puisque leur diamètre hydrodynamique a augmenté après extraction. Néanmoins, la taille des agrégats est dans un domaine acceptable pour les applications biologiques visées.

Pour les particules MSNs-COOH_{rod}, on observe une morphologie en forme de bâtonnets dont la longueur l et la largeur L obtenues par comptage MET valent 956 nm ($c_v = 0,12$) et 494 nm ($c_v = 0,10$). Ces nano-bâtonnets présentent des canaux alignés parallèlement suivant l'axe de la longueur. Les acides carboxyliques étant déprotonés au pH de synthèse, la formation de ces bâtonnets doit impliquer le même mécanisme que les particules MSNs-SH.

3.1.3 Caractérisation par zétamétrie des propriétés électrocinétiques des MSNs fonctionnalisées

Des mesures de potentiels zêta en fonction du pH ont été effectuées sur les nanoparticules fonctionnalisées et comparées à celle des nanoparticules non fonctionnalisées (Figure 3.4).

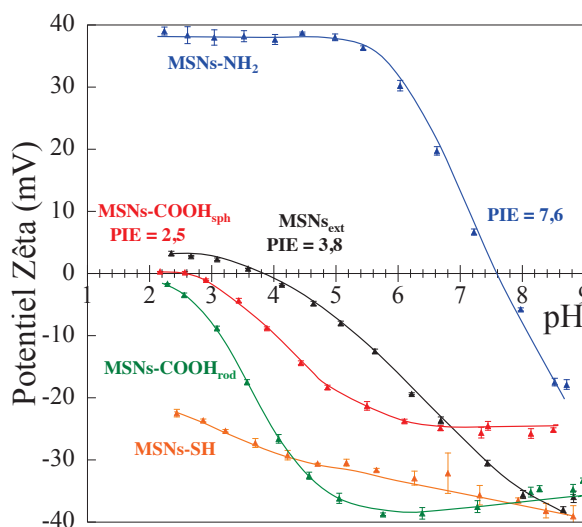


FIGURE 3.4 : Potentiel zêta des nanoparticules fonctionnalisées en fonction du pH. Les courbes servent de guide. Sel de fond : $[NaCl] = 10^{-2}$ M. Les valeurs obtenues pour les MSNs-SH et MSNs-COOH_{rod} sont à prendre avec vigilance puisque les objets sont anisotropes.

Dans le cas des MSNs_{ext}, la courbe de potentiel zêta s'annule vers pH = 3, qui est donc le point isoélectrique de la silice [59, 60, 425].

Pour les MSNs-NH₂, le point isoélectrique se situe aux alentours de pH = 7,6 [206, 426]. Cette nouvelle valeur de PIE atteste de la présence des amines à la surface externe des MSNs-NH₂. En effet, les amines apportées par la co-condensation de l'APTES constituent de nouveaux sites protonables. Le pK_a de l'aminopropyle-silane étant égal à 10,4 [427], la forme ammonium ($R-NH_3^+$) prédomine par rapport à celle des amines primaires ($R-NH_2$) jusqu'à cette valeur de pH. Si les nanoparticules avaient été totalement recouvertes de fonctions amines, le PIE aurait été proche de 10,4. Le PIE mesuré étant égal à 7,6, il reste des groupements silanols disponibles en surface des MSNs, qui se déprotonent au fur et à mesure que le pH augmente et entraîne une neutralisation d'une partie des ammoniums puis une valeur de potentiel zêta négative

caractéristique de la présence des silanolates. De plus, cette faible valeur de PIE par rapport au pK_a de l'aminopropyle-silane peut s'expliquer par la formation d'une espèce zwitterionique ($\equiv SiO^- , ^+H_3NC_3H_6-Si\equiv$) [206, 419]. Pour les MSNs-COOH_{rod} et MSNs-COOH_{sph}, les potentiels zêta sont plus négatifs que les particules non fonctionnalisées pour une même valeur de pH (entre pH 2 et 7), ce qui atteste de la présence des groupements carboxyliques ($pK_a \sim 4,5$) à la surface des particules.

Pour les MSNs-SH, le point isoélectrique se situe en dehors de la zone d'étude. La valeur du potentiel zêta est négative, et ce, dès les plus bas pH, ce qui paraît très surprenant au regard de la valeur du pK_a des groupements mercapto ($pK_a \sim 10$). Par ailleurs, nous avons observé un comportement similaire pour des nanoparticules sphériques dont la surface externe a été fonctionnalisée par le MPTES, ce qui montre que l'anisotropie des particules MSNs-SH n'est pas responsable d'une telle évolution. Cette tendance a également été observée dans de nombreuses études [428–431]. Des études par Spectroscopie de Photoélectrons X (XPS) et spectroscopie InfraRouge (IR) seraient nécessaires afin d'identifier la présence d'autres espèces chimiques en surface des particules MSNs-SH (comme des sulfites), qui peuvent être responsables de cette tendance.

Pour conclure, le greffage des différents organosilanes a modifié les propriétés physico-chimiques de surface des MSNs. Ces modifications se répercutent sur leur comportement en suspension, notamment au niveau des points isoélectriques.

3.1.4 Caractérisation de la structure poreuse des MSNs fonctionnalisées

Les isothermes de sorption de N_2 et les diffractogrammes de ces échantillons sont présentés sur la Figure 3.4. Dans le Tableau 3.4, les propriétés structurales et texturales des MSNs fonctionnalisées sont indiquées et comparées à celles des particules non-fonctionnalisées (MSNs_{ext}).

Pour tous les échantillons, les diffractogrammes montrent quatre pics de Bragg correspondant aux plans (100), (110), (200) et (210), caractéristiques de la géométrie hexagonale bidimensionnelle correspondant au groupe d'espace $P6mm$. La mésostructure est donc préservée pour toutes les fonctionnalisations. Pour les échantillons MSNs_{ext} et MSNs-NH₂, un cinquième pic apparaît à $2\theta = 6,3^\circ$, indiquant une structure à longue distance mieux ordonnée. Pour l'échantillon MSNs-SH, la réflexion (100) est décalée vers des valeurs de 2θ plus élevées, ce qui traduit une diminution du paramètre de maille a_0 .

Toutes les isothermes de sorption de N_2 des particules fonctionnalisées sont de type IV, ce qui est caractéristique des matériaux de type MCM-41. L'étape de condensation capillaire a lieu pour des pressions relatives P/P_0 d'environ 0,3 à l'exception des MSNs-SH où cette étape a lieu pour des pressions relatives P/P_0 inférieures à 0,3. Pour tous les échantillons à l'exception des MSNs-COOH_{rod}, une seconde marche à $P/P_0 > 0,9$ est observée et est due à la présence de porosité inter-particulaire caractéristique de la présence de particules de petite taille.

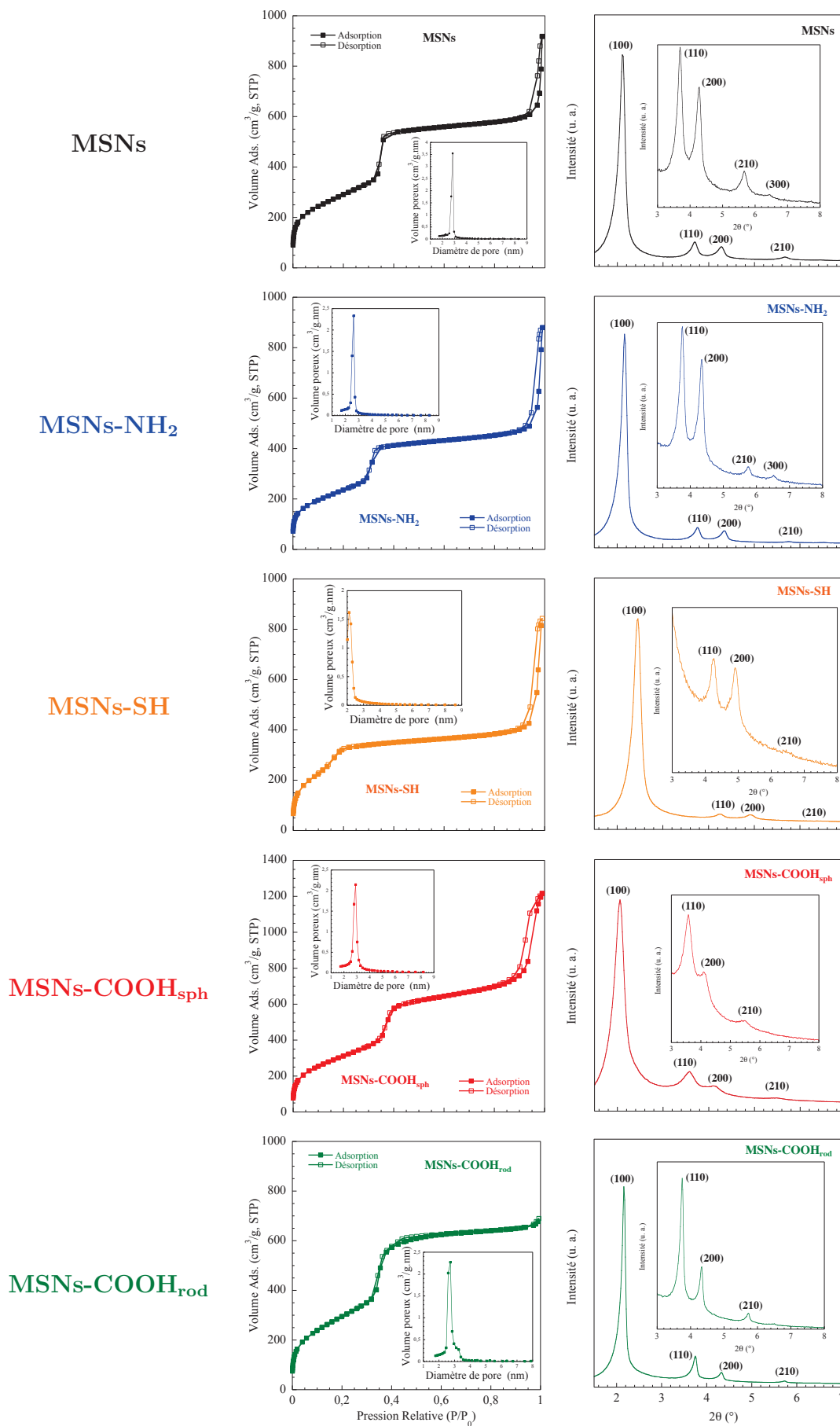


FIGURE 3.5 : Isothermes de sorption de N₂, distributions de taille des pores et diffractogrammes des MSNs fonctionnalisés.

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

TABLEAU 3.4 : *Caractéristiques structurales et texturales des particules fonctionnalisées ou non.*

Échantillon	a_0 (nm)	S_{BET}^a (m ² /g)	V_m^b (cm ³ /g)	D_p^c (nm)	e^d (nm)
MSNs	4,85	1062	0,96	2,8	2,1
MSNs-NH ₂	4,72	870	0,75	2,6	2,1
MSNs-SH	4,17	1225	0,75	2,3	1,8
MSNs-COOH _{rod}	4,74	1114	1,01	2,7	2,0
MSNs-COOH _{sph}	4,98	1166	1,09	3,0	2,0

^a S_{BET} calculée entre $P/P_0 = 0,06 - 0,25$; ^b V_m calculé pour $P/P_0 \leq 0,75$; ^c D_p : Diamètre des pores obtenu par la méthode BJH; ^d e : épaisseur du mur de silice égale $a_0 - D_p$.

Toutes les nanoparticules présentent une surface spécifique élevée et un volume poreux important. Quelle que soit la fonctionnalisation, l'épaisseur des murs de silice reste égale à environ 2,0 nm (Tableau 3.4). En revanche, la taille des pores D_p , le volume poreux V_m , la surface spécifique S_{BET} et la distance centre à centre a_0 évoluent. Par exemple, pour les MSNs-SH, la distance centre à centre a_0 , la taille des pores D_p et le volume mésoporeux V_m ont diminué tandis que la surface spécifique S_{BET} a augmenté (par rapport aux MSNs non-fonctionnalisées), ce qui suggère que les groupements fonctionnels du MPTES ont été incorporés à l'intérieur des canaux des particules [188, 410, 432].

3.1.5 Analyse quantitative du taux de fonctionnalisation

3.1.5.1 Méthode de détermination du taux de fonctionnalisation par analyse élémentaire

Le taux de fonctionnalisation expérimental $\tau_{exp.}$ (mmol/g) est calculé à partir du pourcentage expérimental (%X) de l'élément X de la manière suivante :

$$\tau_{exp.} (mmol/g) = \left(\frac{\%X}{M_X \times 100} \right) \times \frac{10^3}{n_X} \quad (3.1)$$

avec X l'élément considéré ($X = N, S$ et C pour les particules MSNs-NH₂, MSNs-SH et MSNs-COOH_{rod/sph}, respectivement), M_X sa masse molaire et n_X le nombre d'atomes de X de l'organosilane secondaire. Lorsque l'élément carbone est considéré, le taux de fonctionnalisation est déterminé en retranchant le taux de carbone des particules non fonctionnalisées (MSNs_{ext}). Pour exprimer le taux de fonctionnalisation en molécules/nm², la surface spécifique S_{BET} donnée précédemment est considérée.

L'efficacité de la fonctionnalisation (β) est calculée de la manière suivante :

$$\beta (\%) = \left(\frac{\%X_{exp.}}{\%X_{theo.}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

avec $\%X_{theo.}$ le pourcentage théorique de l'élément X défini par l'éq. (3.3).

$$\%X_{theo.} = \left(\frac{n_Y M_X n_X}{n_{TEOS} M_{SiO_2} + n_Y M_{(Y-(OEt)_3)}} \right) \quad (3.3)$$

avec n_Y le nombre de moles d'organosilane secondaire, n_{TEOS} le nombre de moles de TEOS et $M_{(Y-(OEt)_3)}$ la masse molaire de l'organosilane secondaire dépourvu de ces groupements alkoxy ($-OEt$). Toutes ces considérations impliquent que l'organosilane secondaire et le TEOS ont réagi complètement pour former SiO_2 avec le groupement organique symbolisé par $Z-(CH_2)_n-Si$ où Z est le groupement fonctionnel de l'organosilane.

Remarque : on considère que l'organosilane secondaire utilisé pour synthétiser les particules $MSNs-COOH_{rod}$ est sous sa forme « ouverte », *i.e.* sous sa forme carboxylique.

3.1.5.2 Méthode de détermination du taux de fonctionnalisation par analyse thermogravimétrique

Afin de quantifier le taux de fonctionnalisation, les échantillons des MSNs fonctionnalisées sont caractérisés après extraction par ATG. Sur la Figure 3.6, les ATG des particules non fonctionnalisées ($MSNs_{ext}$) et des particules fonctionnalisées par le TESP ($MSNs-COOH_{rod}$) sont présentées afin de décrire la démarche utilisée pour déterminer le taux de fonctionnalisation.

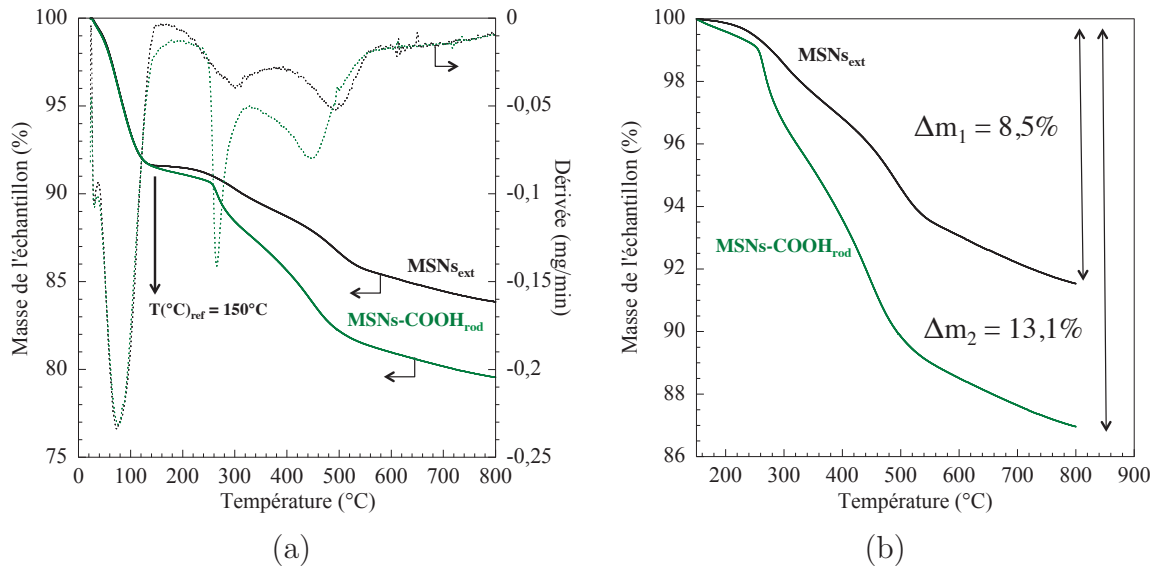


FIGURE 3.6 : Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons MSNs (noir) et $MSNs-COOH_{rod}$ (vert). Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué à 25 mL/min avec une rampe de montée en température de 2°C/min. Les pertes de masse sont calculées en fonction de la masse initiale d'échantillon (a) ou en fonction de la masse à 150°C (b).

Pour les particules $MSNs_{ext}$ comme pour les $MSNs-COOH_{rod}$, une première perte de masse correspondant à l'eau physisorbée (faiblement liée à la surface des particules) a lieu entre la température ambiante et 120°C. Cette perte de masse est d'environ 8% pour les deux échantillons.

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

Pour les MSNs_{ext}, une deuxième perte de masse a lieu entre 150 °C et 400 °C et correspond à la perte de masse de l'eau chimisorbée (fortement liée à la surface des particules). Elle est d'environ 4,2%. La somme des pertes de masse dues à l'eau physisorbée et chimisorbée est donc d'environ 12,2% pour les MSNs_{ext}, ce qui est équivalent à 3,7 molécules d'eau/nm², en considérant une surface spécifique de 1100 m²/g. Cette valeur est située entre 2,5 et 4 molécules d'eau/nm², intervalle donné dans la littérature [433]. Au delà de 400 °C, la courbe ATG des MSNs_{ext} montre une perte de masse correspondant à la déshydroxylation (condensation) des groupements silanols de surface qui peut avoir lieu jusqu'à 1100 °C [149].

Pour les particules MSNs-COOH_{rod}, la perte de masse entre 150 °C et 350 °C, notée Δm_2 , peut être aussi bien attribuée à la désorption de l'eau chimisorbée qu'à la décomposition du composé organique à 150 °C [422, 424, 434, 435]. La perte entre 350 °C et 800 °C est associée à l'oxydation de la chaîne hydrocarbonée ainsi qu'à la déshydroxylation des silanols [436].

Afin de ne pas surestimer le taux de greffage, il convient de prendre en compte d'une part, les quantités d'eau chimisorbée, et d'autre part, la déshydroxylation. Pour ce faire, pour chaque échantillon fonctionnalisé, les pertes de masse dues à la décomposition du composé organique sont calculées en retranchant la perte de masse entre 150 °C (T_{ref} sur la Figure 3.6(a)) et 800 °C obtenue pour l'échantillon non fonctionnalisé. La méthode est illustrée sur la Figure 3.6(b). Cette valeur, notée Δm_1 , est de 8,47%. Cette méthode considère que la perte de masse due à l'eau chimisorbée et à la déshydroxylation sont les mêmes pour tous les échantillons. Cette méthode implique aussi que la perte de masse due au CTAB restant à l'intérieur des canaux est négligeable. Par spectroscopie Raman, il est démontré que le CTAB est extrait dans sa totalité, et ce, pour tous les échantillons fonctionnalisés. Une dernière approximation est faite sur la quantité restante des espèces alkoxy ($-OEt$) provenant du TEOS et des organosilanes. Harlick *et al.* ont démontré que ces espèces résiduelles commençaient à se décomposer à partir de 150 °C [434]. Dans le cadre de cette étude, cette contribution est négligée.

Le taux de fonctionnalisation $\tau_{exp.}$ (mmol/g) est calculé à partir de la différence de perte de masse ($\Delta m_2 - \Delta m_1$) de la manière suivante :

$$\tau_{exp.} (mmol/g) = \frac{(\Delta m_2 - \Delta m_1) \times 1000}{M_{greffon}} \quad (3.4)$$

où $M_{greffon}$ est la masse molaire du greffon organique perdu dans l'intervalle de température, c'est-à-dire sans la fonction alcoxysilane. Les masses molaires considérées seront indiquées dans la section suivante. Pour calculer le taux de fonctionnalisation en molécule/nm², la surface spécifique S_{BET} donnée précédemment est considérée. Le facteur 1000 vient de la transformation du taux de fonctionnalisation exprimé en mmol/g.

L'efficacité de la fonctionnalisation (η) est calculée par la relation suivante :

$$\beta (\%) = \left(\frac{\tau_{exp.}}{\tau_{theo.}} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

avec $\tau_{\text{theo.}}$ le taux théorique de fonctionnalisation (mmol/g) défini par l'expression suivante :

$$\tau_{\text{theo.}} (\text{mmol/g}) = \left(\frac{n_Y}{n_{\text{TEOS}}M_{\text{SiO}_2} + n_Y M_{(Y-(\text{OEt})_3)}} \right) \times 1000 \quad (3.6)$$

avec n_Y le nombre de moles d'organosilane secondaire, n_{TEOS} le nombre de moles de TEOS et $M_{(Y-(\text{OEt})_3)}$ la masse molaire de l'organosilane secondaire dépourvu de ces groupements alkoxy ($-\text{OEt}$). Toutes ces considérations impliquent que l'organosilane secondaire et le TEOS aient réagi complètement pour former SiO_2 avec le groupement organique symbolisé par $\text{Z}-(\text{CH}_2)_n-\text{Si}$ où Z est le groupement fonctionnel de l'organosilane.

3.1.5.3 Résultats et discussion

Dans le Tableau 3.5, les taux de fonctionnalisation expérimentaux ainsi que les efficacités des greffages déterminés par ATG et AE sont donnés. Les pourcentages massiques des éléments N, C, H et S ainsi que les pertes de masse Δm_2 sont également indiqués.

TABLEAU 3.5 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par ATG et AE. Les taux de greffage sont exprimés par rapport à la masse d'échantillon fonctionnalisé. Rappel : $\Delta m_1 = 8,5\%$.

AE							
Échant.	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)	$\tau_{\text{exp.}}$ (mmol/g)	$\tau_{\text{exp.}}$ (molécules/nm ²)	η (%)
MSNs _{ext}	0,0	4,3	1,3	0,0	-	-	-
MSNs-NH ₂	1,1	4,9	1,5	0,0	0,79	0,54NH ₂	49
MSNs-SH	0,0	10,1	2,4	3,9	1,2	0,61SH	79
MSNs-COOH _{rod}	0,0	7,9	1,7	0,0	0,43	0,46COOH	57
MSNs-COOH _{sph}	0,0	6,4	1,5	0,0	0,58	0,30COOH	40
ATG							
Échant.	T _{orga} ^a (°C)	Δm_2 (%)	Δm_{2-1} ^b (%)	M _{greffon} (g/mol)	$\tau_{\text{exp.}}$ (mmol/g)	$\tau_{\text{exp.}}$ (molécules/nm ²)	η (%)
MSNs-NH ₂	220	12,2	3,7	58	0,64	0,44NH ₂	40
MSNs-SH	302	18,7	10,2	75	1,36	0,67SH	87
MSNs-COOH _{rod}	264	13,1	4,6	141	0,32	0,35COOH	38
MSNs-COOH _{sph}	500	12,7	4,2	73	0,58	0,30COOH	40

^aT_{orga} : température à laquelle la dérivée de la perte de masse est maximale ; ^b $\Delta m_{2-1} = \Delta m_2 - \Delta m_1$.

Avec deux techniques de caractérisation différentes, les taux de fonctionnalisation obtenus sont très proches. Pour les MSNs-NH₂, le taux est égal à environ 0,4NH₂/nm². Pour les deux particules possédant des fonctions carboxyliques, les taux sont très similaires et valent environ 0,3COOH/nm². Les MSNs-SH possèdent le plus grand taux de fonctionnalisation puisqu'il est égal à 0,7SH/nm², ce qui est cohérent avec le fait que l'efficacité de la fonctionnalisation est la plus élevée pour cet échantillon.

Dans le cas de la synthèse de nanoparticules mésoporeuses de silice par co-condensation et en utilisant un rapport molaire TEOS/APTES égal à 10/1, Kobler *et al.* obtiennent une perte

de masse due à la présence de l'organosilane de 15%, donc proche de celle que nous obtenons (13%) [422]. Dans le cas de la fonctionnalisation par l'APTES de matériaux de type MCM-41 et en utilisant également un rapport TEOS/APTES égal à 10/1, Yokoi *et al.* obtiennent à partir de l'analyse élémentaire de l'élément N un taux de fonctionnalisation égal à 0,83 mmol/g, ce qui est proche de celui que nous obtenons (0,79 mmol/g) [437].

3.1.6 Caractérisations spectroscopiques des MSNs fonctionnalisés

3.1.6.1 Spectroscopie RMN du ^{29}Si à l'état solide

Afin de montrer que les espèces organiques sont ancrées au réseau silicique, des analyses RMN ^{29}Si MAS à l'état solide ont été réalisées soit en simple impulsion (découplé ^1H), soit en polarisation croisée avec rotation à l'angle magique (^1H - ^{29}Si CPMAS). Les spectres obtenus sont représentés sur la Figure 3.7. Pour des raisons techniques, l'échantillon MSNs-COOH_{rod} n'a pu être caractérisé. Les pourcentages des espèces Q^n et T^m pour les échantillons MSNs-SH, MSNs-COOH_{sph} et MSNs-NH₂ sont donnés dans le Tableau 3.6.

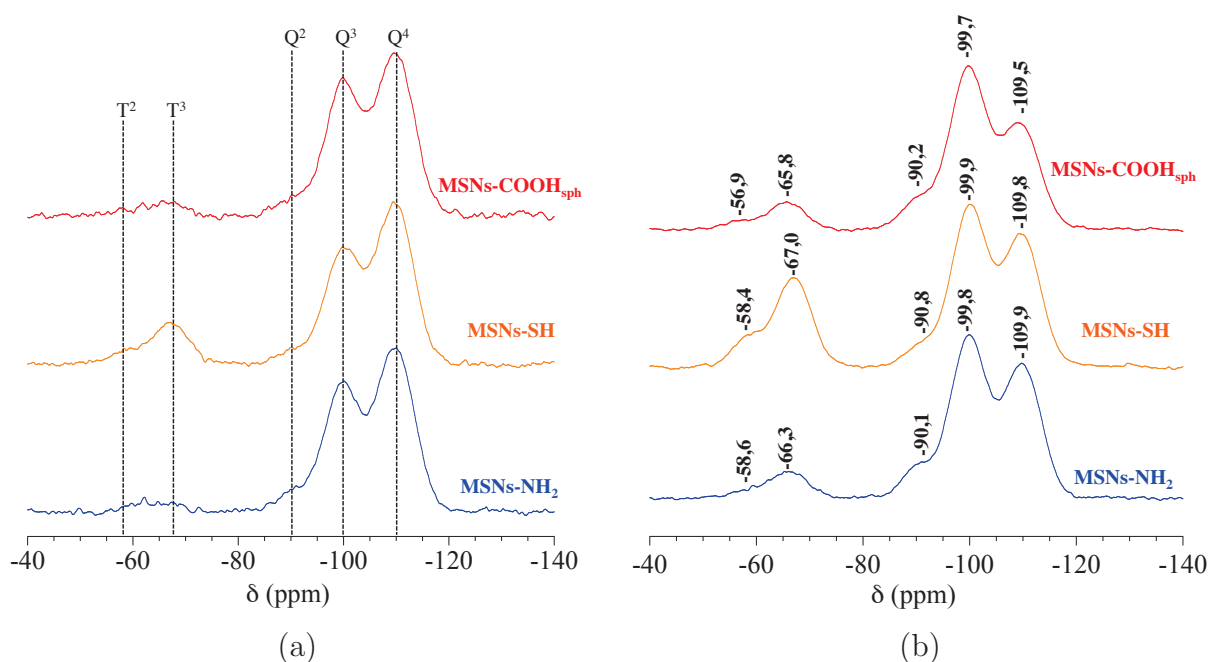


FIGURE 3.7 : Spectres RMN ^{29}Si MAS des particules MSNs-SH, MSNs-NH₂ et MSNs-COOH_{sph} en simple impulsion (a) et en polarisation croisée (b). Mesures réalisées sur les échantillons avant extraction.

Trois résonances à environ -110, -100 et -90 ppm, correspondant respectivement aux unités Q^4 ($\text{Si}(\text{OSi})_4$), Q^3 ($\text{Si}(\text{OSi})_3(\text{OH})$) et Q^2 ($\text{Si}(\text{OSi})_2(\text{OH})_2$) sont détectées pour les trois échantillons et sont caractéristiques de la structure silicique [78]. Les résonances caractérisant la présence d'organosilane sont également observées. Il s'agit d'unités trifonctionnelles $T^m = \text{RSi}(\text{OSi})_m(\text{OH})_{3-m}$, $m = 2-3$ (représentée sur la Figure 3.8), où m étant le nombre d'oxygènes pontants liés à l'atome central. Elles sont détectées à -66 ppm et -57 ppm pour les espèces T^3 et T^2 , respectivement.

Les spectres présentés sur la Figure 3.7(a) ont été enregistrés en simple impulsion. Ces mesures sont quantitatives. Cependant, les résonances correspondant aux unités Q^n et T^m détectées entre -120 et -50 ppm sont larges et très mal définies, ce qui complique la déconvolution. Ainsi, la RMN en polarisation croisée avec rotation à l'angle magique, nommée ^{29}Si CPMAS, a été utilisée pour fixer la position et la largeur de raie (Figure 3.7(b)) afin de les introduire dans le modèle des spectres de RMN simple impulsion. L'aire de chaque signal et donc les proportions de chaque espèce Q^n et T^m au sein du matériau sont déterminées.

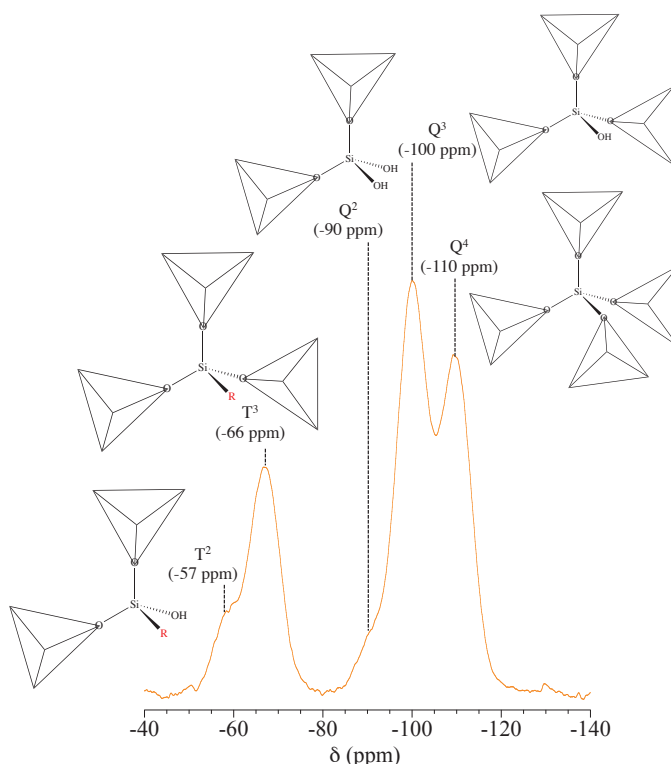


FIGURE 3.8 : Spectres RMN ^{29}Si MAS en polarisation croisée pour l'échantillon MSNs-SH avant extraction. On indique sur la figure le type de liaison (avec les déplacements chimiques) que peut former l'atome de silicium en fonction de son environnement.

TABLEAU 3.6 : Pourcentages respectifs des espèces Q^n et T^m des particules MSNs, MSNs-SH, MSNs-COOH_{sph} et MSNs-NH₂. Le pourcentage d'erreur sur la détermination des contributions est d'environ 5%.

Échant.	$^N Q^4$ (%)	$^N Q^3$ (%)	$^N Q^2$ (%)	T^3 (%)	T^2 (%)	$\sum(\text{Si-OH})/\sum\text{Si}$	$\sum(\text{Si-C})/\sum\text{Si}$
MSNs	57	36	7	-	-	0,50	-
MSNs-NH ₂	53	43	4	2	1	0,50	0,03
MSNs-SH	56	41	3	12	3	0,43	0,15
MSNs-COOH _{sph}	54	42	4	4	1	0,48	0,05

^N Afin de pouvoir comparer les matériaux entre eux, une normalisation a été effectuée : la somme des espèces Q^n est ramenée à 100%. $\sum(\text{Si-OH})/\sum\text{Si} = \sum(Q^3 + 2Q^2 + T^2)/\sum(Q^n + T^m)$ et $\sum(\text{Si-C})/\sum\text{Si} = \sum T^m/(T^m + Q^n)$ [437] en prenant les valeurs des Q^n sans normalisation.

Pour toutes les nanoparticules fonctionnalisées, les proportions des espèces Q^4 sont similaires et proches de la proportion des espèces Q^4 des nanoparticules non fonctionnalisées (Tableau 3.6).

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

En revanche, les proportions des espèces Q^3 augmentent tandis que les proportions des espèces Q^2 diminuent lorsque les MSNs sont fonctionnalisées. Le rapport $\sum(\text{Si-OH})/\sum\text{Si}$ diminue lorsque les particules sont fonctionnalisées, ce qui montre que la quantité de silanols a diminué. Parmi les MSNs fonctionnalisées, l'échantillon MSNs-SH est celui qui possède les proportions des contributions T^3 et T^2 les plus élevées, ce qui suggère une quantité d'organosilane au sein du matériau plus importante. Les rapports $\sum(\text{Si-C})/\sum\text{Si}$ reflètent cette tendance et sont en cohérence avec les analyses élémentaires et thermogravimétriques qui montrent un rendement de fonctionnalisation plus élevé pour cet échantillon.

3.1.6.2 Spectroscopie FT-IR des MSNs non fonctionnalisées

Les spectres sont collectés pour des nombres d'onde $\bar{\nu}$ compris entre 400 et 4000 cm^{-1} après 100 passages de faisceau et avec une résolution de 2 cm^{-1} . La poudre est déposée entre deux pastilles de KBr puis le tout est placé dans une chambre connectée au vide et entourée d'un manchon chauffant. Un thermocouple assure le contrôle de la température à l'intérieur de la chambre. Plus d'informations sont disponibles en Annexe E.2 et dans la référence [438]. Dans ces conditions, plusieurs spectres sont réalisés : à température ambiante, sous vide dynamique et sous vide dynamique après chauffage. Les spectres des MSNs non fonctionnalisées mesurés dans ces différentes conditions sont indiquées sur la Figure 3.9.

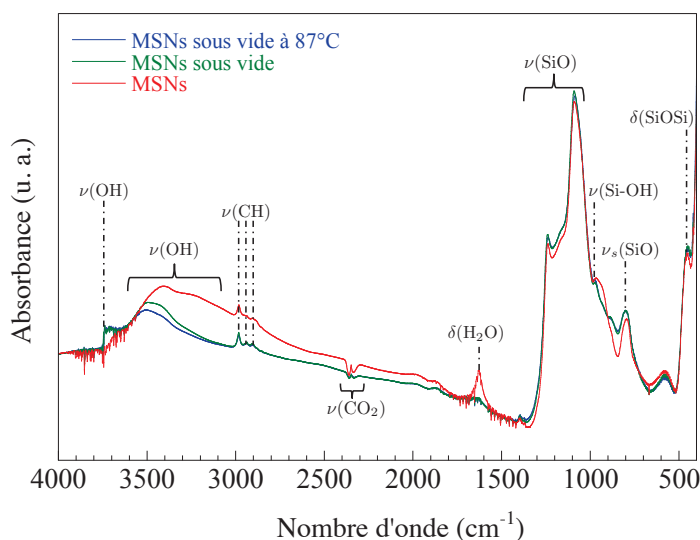


FIGURE 3.9 : Spectres infrarouges expérimentaux des MSNs non fonctionnalisées et mesurés à l'air ambiant (rouge), sous vide dynamique (vert) et sous vide à 87 °C (bleu).

La présence d'eau adsorbée à la surface des particules se manifeste par l'existence de deux bandes de vibration $\nu(\text{OH})$ et $\delta(\text{H}_2\text{O})$ localisées respectivement à 3400 cm^{-1} et 1630 cm^{-1} [439]. Lorsque l'échantillon est placé sous vide ou chauffé à 87 °C, la bande de vibration localisée à 1630 cm^{-1} disparaît complètement tandis que la bande à 3400 cm^{-1} se décale à 3490 cm^{-1} et diminue très largement en intensité, ce qui montre qu'une partie de l'eau adsorbée à la surface a été éliminée.

Les bandes de vibration localisées à des nombres d'onde compris entre 1600 et 400 cm^{-1} correspondent aux modes de vibration caractéristiques de la charpente du matériau silicique [152]. La bande la plus intense localisée à 1090 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation asymétrique $\nu_a(\text{SiO})$ des liaisons Si-O. Les bandes de vibration localisées à 798 cm^{-1} et 450 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'élongation symétrique $\nu_s(\text{SiO})$ des liaisons Si-O et de déformation $\delta(\text{SiOSi})$ des groupements siloxanes Si-O-Si. Enfin, la bande localisée à 970 cm^{-1} est assignée à la vibration d'élongation $\nu(\text{Si-OH})$ des groupements silanols Si-OH [155]. Lorsque l'échantillon est placé sous vide et chauffé à 87 °C, la position et l'intensité de ces bandes n'évoluent pas.

Dès lors que l'échantillon est placé sous vide ou chauffé à 87 °C, les spectres montrent que deux nouvelles bandes apparaissent à 3750 et 3500 cm^{-1} . La première bande correspond à la vibration d'élongation $\nu(\text{OH})$ des liaisons OH des groupements silanols libres ou géminés. La deuxième bande est attribuée à la vibration des liaisons OH des groupements silanols pontés [154, 156] (Figure 3.10).

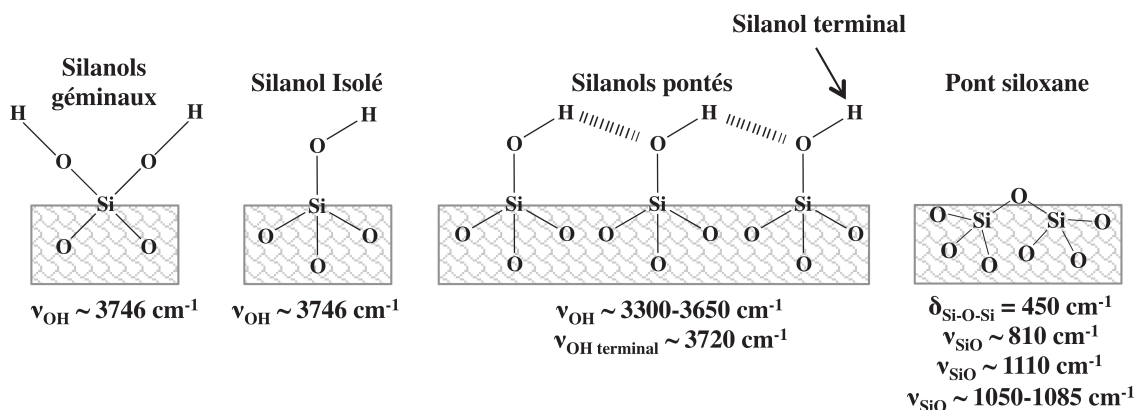


FIGURE 3.10 : Représentation schématique des groupements de surface des MSNs et attributions des bandes de vibration infrarouges correspondantes [154–156, 205].

Enfin, les bandes d'adsorption des vibrations d'élongation $\nu(\text{CH})$ des liaisons C-H des groupements CH_2 et CH_3 provenant des groupements alkoxy du TEOS sont visibles à 2982, 2938 et 2905 cm^{-1} . Aucune bande caractéristique du CTA^+ n'apparaît sur le spectre infrarouge [440]. Le tensioactif a donc été extrait dans sa totalité, ce qui confirme les résultats obtenus par spectroscopie Raman (résultats non montrés).

3.1.6.3 Spectroscopie FT-IR des particules MSNs- NH_2

Les nanoparticules mésoporeuses fonctionnalisées avec l'APTES ont été caractérisées par spectroscopie FT-IR en utilisant la même méthode que pour les particules non fonctionnalisées. Les spectres des MSNs- NH_2 pour des nombres d'onde $\bar{\nu}$ allant de 2700 à 4000 cm^{-1} et de 1250 à 1750 cm^{-1} sont présentés sur la Figure 3.11. Un résumé des bandes observées avec leur assignation est indiqué dans le Tableau 3.7.

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

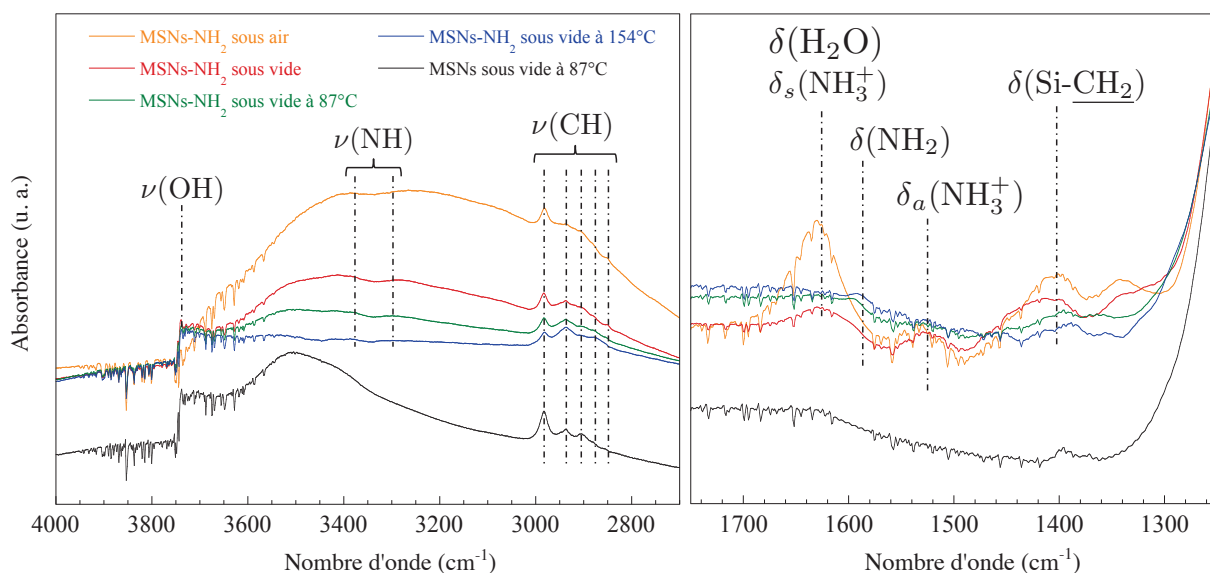


FIGURE 3.11 : Spectres infrarouges expérimentaux des MSNs-NH₂ sous air et sous vide à différentes températures. Le spectre des MSNs non fonctionnalisées sous vide à 87 °C est indiqué en noir.

TABLEAU 3.7 : Bandes de vibrations observées pour les MSNs fonctionnalisées avec l'APTES.

Bande (cm ⁻¹)	Assignment	Référence
3749	$\nu(\text{OH})$	[156]
3384	$\nu_a(\text{NH})$	[441–443]
3302	$\nu_s(\text{NH})$	[441, 442]
3000-2800	$\nu(\text{C-H})$	[444]
1629	$\delta(\text{H-O-H})$ et/ou $\delta_s(\text{NH}_3^+)$	[445]
1595	$\delta(\text{NH}_2)$	[441]
1529	$\delta_a(\text{NH}_3^+)$	[441]
1413	$\delta(\text{Si-CH}_2)$	[446]

Les particules MSNs-NH₂ présentent les bandes caractéristiques de la structure silicique entre 450 et 1500 cm⁻¹ (résultats non montrés). De la même façon que pour les particules non fonctionnalisées, la présence d'eau adsorbée à la surface des particules se manifeste par l'existence de deux bandes de vibration $\nu(\text{OH})$ et $\delta(\text{H}_2\text{O})$ localisées respectivement à 3400 cm⁻¹ et 1629 cm⁻¹.

Dans la zone spectrale des nombre d'onde $\bar{\nu}$ compris entre 3600 et 3200 cm⁻¹, la présence de deux bandes de vibration localisées à 3384 et 3302 cm⁻¹ et caractéristiques des vibrations d'élongations $\nu(\text{NH})$ symétriques et asymétriques des liaisons N-H attestent de la présence au sein du matériau des groupements amines.

Les bandes de vibration entre 2800 et 3000 cm⁻¹ correspondent à des bandes de vibration d'élongation $\nu(\text{CH})$ des liaisons C-H caractéristiques de la chaîne méthylénique du silane mais aussi des groupements alkoxy du TEOS.

Dans le domaine spectral où les vibrations d'élongations $\nu(\text{OH})$ des hydroxyles interviennent, les silanols isolés (ou géminés) vibrent à 3749 cm⁻¹ dès lors que l'échantillon est placé sous vide. Par rapport aux spectres des particules non fonctionnalisées, la bande de vibration d'élongation

$\nu(\text{OH})$ des groupements silanols pontés située entre 3500 et 3700 cm^{-1} est moins marquée, ce qui pourrait s'expliquer par un nombre de groupements silanols au sein du matériau moins important que pour l'échantillon non fonctionnalisé.

Lorsque l'échantillon est caractérisé sous air, la bande de vibration de déformation symétrique $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ du groupement ammonium apparaît à 1629 cm^{-1} mais est confondue avec la bande de vibration de déformation $\delta(\text{H}_2\text{O})$ de la molécule d'eau. La présence de la vibration de déformation asymétrique $\delta_a(\text{NH}_3^+)$ du groupement ammonium atteste que lorsque l'eau est adsorbée à la surface des particules, les groupements amines sont protonés.

Contrairement à ce qu'il a été observé pour les particules non fonctionnalisées, la bande de vibration à 1629 cm^{-1} ne disparaît pas complètement lorsque la mesure est réalisée sous vide. Dans ce cas, deux hypothèses peuvent être émises : soit il reste de l'eau dans les canaux (à cause de la présence de fortes interactions hydrogènes avec les amines), soit il n'y a plus d'eau dans les canaux et la seule contribution de cette bande provient de la vibration de déformation $\delta(\text{NH}_3^+)$ du groupement ammonium. Par ailleurs, lorsque l'échantillon est placé sous vide, la vibration de déformation $\delta(\text{Si}-\text{CH}_2)$ des CH_2 de la chaîne méthylénique du silane apparaît décalée et s'est déplacée de 1413 cm^{-1} à 1394 cm^{-1} .

Dès lors que l'échantillon est chauffé à 154 °C, les vibrations de déformation symétrique $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ et asymétrique $\delta_a(\text{NH}_3^+)$ du groupement ammonium disparaissent au profit de l'apparition d'une bande de vibration faible à 1595 cm^{-1} , caractéristique de la vibration de déformation $\delta(\text{NH}_2)$ du groupement NH_2 qui interagit avec les groupements silanols de surface *via* des liaisons hydrogènes [447]. De plus, la vibration de déformation $\delta(\text{Si}-\text{CH}_2)$ des CH_2 de la chaîne méthylénique du silane s'est décalée à 1390 cm^{-1} . Dans ces conditions, la déshydratation du matériau doit probablement induire la déprotonation du groupement NH_3^+ . Cette conversion implique certainement un changement au niveau de la structure cyclique formée entre l'ammonium et les silicates et peut expliquer le décalage de la bande de vibration de déformation $\delta(\text{Si}-\text{CH}_2)$ des CH_2 de la chaîne méthylénique du silane (Figure 3.12) [419, 447–449].

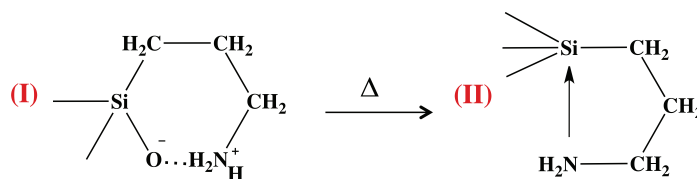


FIGURE 3.12 : Représentation de l'espèce zwitterionique sous sa forme « hydratée » (I) et sous sa forme « déshydratée » (II).

3.1.6.4 Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-COOH_{rod}

Les particules fonctionnalisées avec le TESP ont été caractérisées par spectroscopie FT-IR en utilisant la même méthode déjà décrite précédemment. Les spectres des particules MSNs-COOH_{rod} pour des nombres d'onde $\bar{\nu}$ compris entre 4000 et 400 cm^{-1} sont présentés sur la Figure 3.13.

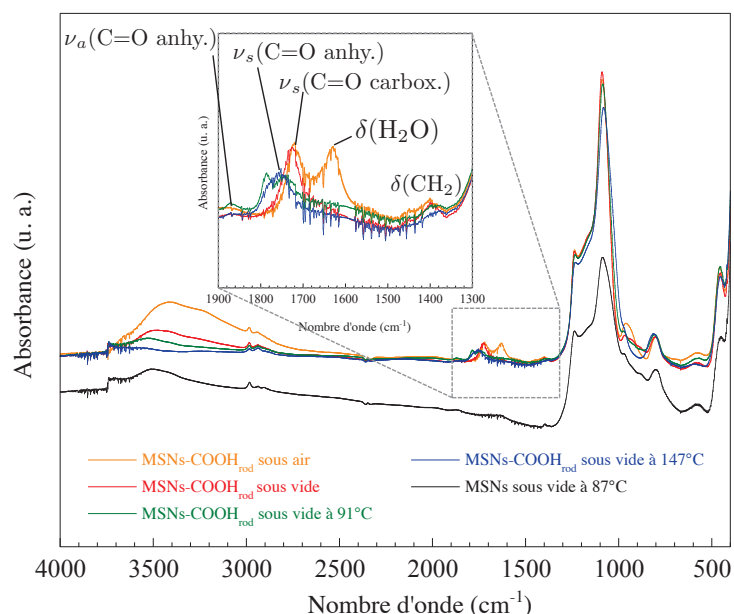


FIGURE 3.13 : Spectres infrarouges expérimentaux des $MSNs-COOH_{rod}$ sous air et sous vide à différentes températures. Le spectre des $MSNs$ non fonctionnalisées sous vide à $87^{\circ}C$ est indiqué en noir.

Les spectres des $MSNs-COOH_{rod}$ présentent les mêmes bandes de vibration que les particules non fonctionnalisées mise à part pour deux zones spectrales allant de 1900 à 1300 cm^{-1} et de 3600 à 3400 cm^{-1} .

Entre 1900 et 1500 cm^{-1} , le spectre réalisé sous air montre deux bandes de vibration localisées à 1719 et 1628 cm^{-1} . Elles sont associées respectivement à la vibration d'élongation symétrique $\nu_s(C=O)$ du carbonyle $C=O$ présent au sein de la fonction carboxylique et à la vibration de déformation associée à l'eau adsorbée sur le matériau [450]. Dès lors que l'échantillon est placé sous vide, la bande de vibration associée à l'eau disparaît.

Lorsque l'échantillon est chauffé à $91^{\circ}C$, deux nouvelles bandes de vibration apparaissent à 1786 et 1870 cm^{-1} . Ces bandes sont caractéristiques des vibrations d'élongation symétrique $\nu_s(C=O)$ et asymétrique $\nu_a(C=O)$ du carbonyle $C=O$ présent dans la fonction anhydride succinique [164, 451]. A cette température, la bande de vibration associée au carbonyle de l'acide carboxylique s'est déplacée de 1719 cm^{-1} à 1743 cm^{-1} . Une autre bande associée à la vibration déformation des liaisons CH_2 du groupement propyle de la chaîne greffée apparaît à 1400 cm^{-1} [342, 452].

Quand l'échantillon est chauffé à $147^{\circ}C$, il ne reste que les deux bandes de vibration associées à la présence des carbonyles présents dans la fonction anhydride succinique. Elles sont localisées à 1870 et 1753 cm^{-1} . Cette évolution montre qu'à l'air ambiant, les groupements présents dans le matériau sont sous la forme carboxylique (forme « ouverte »), tandis que lorsque l'échantillon est chauffé, l'anhydride succinique se forme par l'intermédiaire d'un cycle à cinq, comme le montre le schéma de la Figure 3.14.

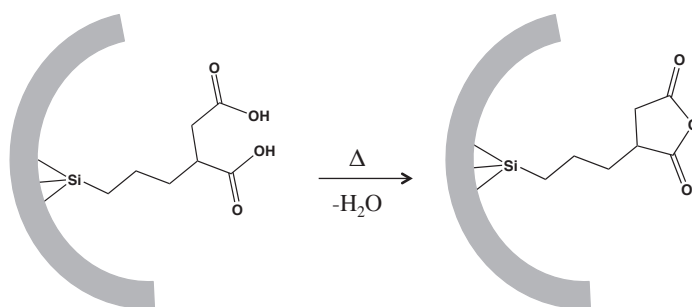


FIGURE 3.14 : Formation de l'anhydride succinique par déshydratation de l'acide dicarboxylique.

Entre 3600 et 3400 cm^{-1} , la bande de vibration associée à la vibration d'élongation $\nu(\text{OH})$ des silanols pontés est beaucoup moins intense que pour les particules non fonctionnalisées, ce qui atteste que le nombre de silanols au sein du matériau est moins important.

3.1.6.5 Spectroscopie FT-IR des particules MSNs- COOH_{sph}

Les particules MSNs- COOH_{sph} ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge en utilisant la même méthode déjà décrite précédemment. Sur la Figure 3.15, les spectres infrarouges des MSNs- COOH_{sph} sous air et sous vide à différentes températures sont indiqués par rapport aux MSNs non fonctionnalisées.

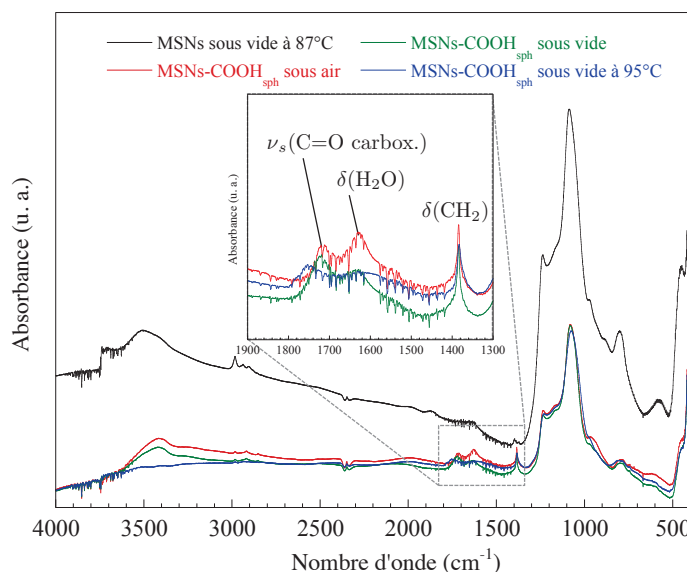


FIGURE 3.15 : Spectres infrarouges expérimentaux des MSNs- COOH_{sph} sous air et sous vide à différentes températures. Le spectre des MSNs non fonctionnalisées sous vide à 87°C est indiqué en noir.

Les spectres des MSNs- COOH_{sph} présentent les mêmes bandes de vibration que les particules non fonctionnalisées mise à part pour deux zones spectrales allant de 1900 à 1300 cm^{-1} et de 3600 à 3400 cm^{-1} .

Entre 1900 et 1300 cm^{-1} , le spectre des MSNs- COOH_{sph} réalisé sous air montre trois bandes de vibration supplémentaires à 1718, 1628 et 1384 cm^{-1} . Ces trois bandes correspondent respectivement aux vibrations d'élongation $\nu_s(\text{C}=\text{O})$ du carbonyle $\text{C}=\text{O}$ de la fonction carboxylique, de

3.1. Synthèse des MSNs fonctionnalisées par co-condensation

déformation associée à l'eau adsorbée sur le matériau et de déformation $\delta(\text{CH}_2)$ du groupement éthyle de la chaîne greffée [342, 452].

Dès lors que l'échantillon est placé sous vide, la bande associée à l'eau physisorbée disparaît. Lorsque l'échantillon est chauffé sous vide à 95 °C, la bande de vibration d'élongation associée à la présence de l'acide carboxylique se décale à 1753 cm^{-1} .

Par rapport au spectre des MSNs non fonctionnalisées, la bande de vibration d'élongation $\nu(\text{OH})$ des groupements silanols pontés localisée entre les nombres d'onde 3300 et 3650 cm^{-1} est beaucoup moins intense, ce qui montre que le nombre de silanols au sein du matériau est moins important. L'intensité de la bande de vibration d'élongation $\nu(\text{OH})$ des silanols isolés localisée à 3740 cm^{-1} est également moins intense.

3.1.6.6 Spectroscopie Raman des particules MSNs-SH

A cause de la faible sensibilité de la spectroscopie FT-IR vis-à-vis des fonctions thiols en raison d'un faible moment dipolaire de ces liaisons [430, 453], les particules fonctionnalisées avec le MPTES ont été caractérisées par spectroscopie Raman. *A contrario*, les pics caractéristiques des fonctions carboxyliques et amines sont soit très faibles en spectroscopie Raman, soit présents dans une zone spectrale où les bandes de vibration de l'eau dominent [422]. C'est pour cette raison que les échantillons MSNs-COOH_{rod/sph} et MSNs-NH₂ ont été caractérisés par spectroscopie IR plutôt que par spectroscopie Raman.

Les spectres du MPTES, des particules non fonctionnalisées et des particules MSNs-SH sont présentés sur la Figure 3.16. Les bandes caractéristiques de la silice, des MSNs-SH et du MPTES sont reportées dans le Tableau 3.8 [381, 432, 454–458].

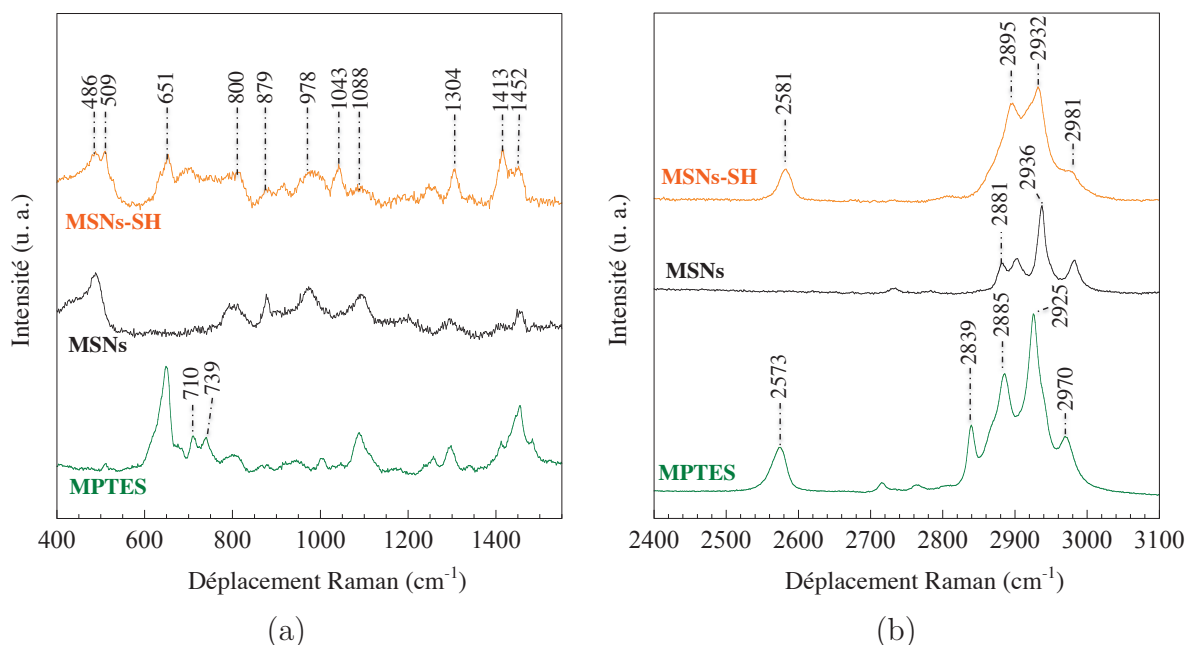


FIGURE 3.16 : Spectres Raman allant de 400 à 1550 cm^{-1} (a) et de 2400 à 3100 cm^{-1} (b) du précurseur MPTES, des particules non fonctionnalisées et des particules MSNs-SH avant extraction à l'HCl. Les mesures sont effectuées à 25 °C en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 532 nm.

TABEAU 3.8 : Bandes de vibrations observées pour le MP TES, les particules non fonctionnalisées et les MSNs-SH.

Bande (cm ⁻¹)	Assignation	Bande (cm ⁻¹)	Assignation
486	$\nu(\text{SiO}_4)(\text{D1})$	1452	$\delta(\text{CH}_2)/\delta(\text{CH}_3)$ (MP TES)
509	$\nu(\text{S-S})$ [type (H,H)] [458]	2573	$\nu(\text{SH})$
651	$\nu(\text{C-Si})$	2581	$\nu(\text{SH})$
710	$\nu(\text{C-S})$	2839	$\nu_s(\text{CH}_3)$ (MP TES)
739	$\nu(\text{C-S})$	2881	$\nu_s(\text{CH}_3)$ (TEOS)
800	$\nu_s(\text{Si-O} + \text{C-O})$	2885	$\nu_s(\text{CH}_2)$ (MP TES)
879	$\nu_s(\text{C-C} + \text{C-O})$	2895	$\nu_s(\text{CH}_2)$
978	$\nu_s(\text{Si-OH})$	2925	$\nu_a(\text{CH}_2)/\nu_a(\text{CH}_3)$
1043	$\nu_s(\text{Si-O-C})$	2932	$\nu_a(\text{CH}_2)/\nu_a(\text{CH}_3)$
1088	$\nu_a(\text{Si-O-C})$	2936	$\nu_a(\text{CH}_2)/\nu_a(\text{CH}_3)$
1304	$\nu_s(\text{CH}_2)$	2970	$\nu_a(\text{CH}_2)$ (MP TES)
1413	$\delta(\text{CH}_2)$ (MP TES)	2981	$\nu_a(\text{CH}_2)$ (TEOS)

Les pics à 486, 800 et 978 cm⁻¹ caractéristiques de la silice sont observés. En outre, nous retrouvons les principaux pics caractéristiques du précurseur MP TES à 651, 1304, 1043 et 1452 cm⁻¹. La présence d'un pic à 509 cm⁻¹ caractéristique des ponts disulfures (S-S) prouve que dans notre matériau, certains groupements thiols se sont dimérisés. Ce pic est également observé pour le précurseur même si son intensité est faible. Le pic localisé à 2581 cm⁻¹ caractéristique de la vibration d'élongation $\nu(\text{SH})$ est retrouvé sur le spectre des MSNs-SH et atteste de la présence au sein du matériau des groupements thiolés.

Un pic très intense apparaît à 1413 cm⁻¹. Celui-ci peut provenir soit de la vibration de déformation $\delta(\text{CH}_2)$ des groupements éthyles CH₂ de la chaîne carbonée du MP TES, soit de la présence d'ions NH₄⁺. Cette dernière hypothèse est plus probable puisque le spectre présenté sur la Figure 3.16 est celui des particules avant extraction à l'HCl en milieu alcoolique. Dans ces conditions, le pourcentage d'azote déterminé par analyse élémentaire est égal à 8,1%. Après extraction à l'HCl, la présence de photoluminescence importante ne nous a pas permis d'obtenir un spectre interprétable.

3.2 Greffage de polymères à la surface externe des MSNs

Un vecteur, qu'il soit formulé pour la **thérapie** ou la **détection** de pathologies, doit dans un premier temps être **dispersé** de manière satisfaisante en milieu physiologique. *In vivo*, la taille du nanohybride est un facteur déterminant pour le passage à travers les capillaires sanguins ou les cellules endothéliales [16]. *In vitro*, une bonne dispersion permet de toucher un maximum de cellules avec une dose minimale de nanovecteurs.

Afin d'améliorer la dispersion et la furtivité des nanoparticules mésoporeuses de silice, le greffage covalent de polymères en surface des nanoparticules **préalablement modifiées par des acides carboxyliques** est étudiée. Nos choix se sont portés sur deux polymères commercialement disponibles et très largement utilisés pour stabiliser les nanoparticules en

3.2. Greffage de polymères à la surface externe des MSNs

milieu physiologique : un méthoxy-PEG₁₀₀₀₀-NH₂ (mPEG₁₀₀₀₀-NH₂) et une polyéthylène imine (PEI₁₈₀₀) dont les masses molaires sont respectivement égales à 10 kDa et 1,8 kDa.

Le mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ est un polymère linéaire neutre composé de 226 monomères d'éthylènes glycols (CH₂-CH₂-O) qui ne possède qu'une terminaison potentiellement réactive avec les acides carboxyliques de surface. Sa formule est :

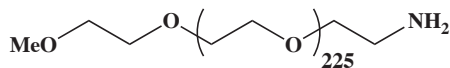


FIGURE 3.17 : Formule du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂.

La PEI₁₈₀₀ est un polymère cationique branché possédant de nombreux sites amines (primaires, secondaires et tertiaires) susceptibles de se protoner au pH physiologique et de réagir avec les acides carboxyliques de surface. Contrairement aux PEI de fortes masses molaires (10 000, 25 000 et 60 000 g/mol), la PEI₁₈₀₀ n'est pas cytotoxique [230, 459]. Sa formule est :

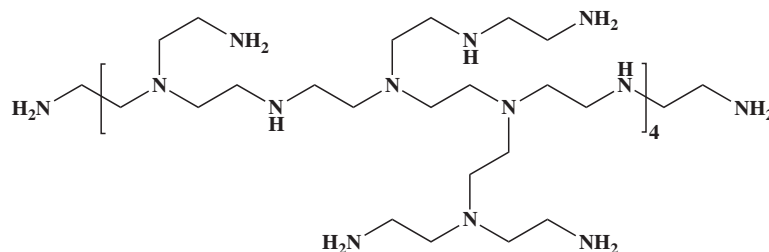


FIGURE 3.18 : Formule de la polyéthylènimine (PEI) branchée. Ce polymère de haute densité de charges comporte des amines primaires, secondaires et tertiaires. Les pK_a de la PEI₁₈₀₀ ont été déterminés par dosage : $pK_{a1} = 10,7$; $pK_{a2} = 8,3$ et $pK_{a3} = 7,1$ [459].

En plus de pouvoir améliorer la dispersion et la furtivité des nanovecteurs avec le greffage de ces deux polymères, l'objectif est aussi d'étudier l'influence que peuvent avoir ces deux polymères sur l'adsorption, l'encapsulation et le relargage du cisplatine (CDDP).

3.2.1 Conditions opératoires

3.2.1.1 Réactifs utilisés

Les synthèses décrites ci-dessous ont nécessité en plus des produits chimiques déjà présentés dans le paragraphe 3.1.1.1 de ce chapitre : du méthoxyPEG-NH₂ (mPEG₁₀₀₀₀-NH₂, M_W = 11153 Da, IRIS-BIOTECH) comme agent de dispersion stérique, de la PolyéthylèneImine (PEI, M_W = 1800 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, CAS 9002-98-6, 50% (m/m) dans l'eau) comme agent de dispersion électro-stérique, du N-hydroxysuccinimide (NHS, M_W = 115,09 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, CAS 6066-82-6, 98%) et du (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) (EDC, M_W = 191,7 g.mol⁻¹, SIGMA-ALDRICH, CAS 25952-53-8, 98%) comme agents de couplage. Les solvants comme le dichlorométhane et l'éther diéthylique ont été utilisés sans purification préalable, seul le toluène a été distillé avant d'être utilisé.

3.2.1.2 Procédure de greffage des acides carboxyliques à la surface externe des MSNs

Les nanoparticules de silice ont été synthétisées en utilisant les mêmes conditions expérimentales déjà décrites dans la section 3.1.1.2 (protocole de « référence »). Nous résumons le protocole opératoire dans la Figure 3.19. Après synthèse et renforcement (méthode présentée en section 2.2.9.1), les nanoparticules sont lavées à l'eau distillée par centrifugation (24 652 g, 20 minutes) jusqu'à ce que la conductivité des eaux de lavage soit inférieure à 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La dernière centrifugation est réalisée dans l'éthanol. Afin d'éliminer le CTAB adsorbé en surface des MSNs et ainsi de rendre accessible les fonctions silanols de surface, une « extraction » soxhlet est réalisée dans l'éthanol pendant 24 heures. Après cette étape d'extraction, les particules sont lavées plusieurs fois à l'eau déminéralisée par centrifugation, redispersées, congelées à l'azote liquide puis lyophilisées. La lyophilisation est utilisée car elle permet d'une part d'éliminer l'eau sans produire d'aggrégation entre les particules, et d'autre part, de ne pas dégrader la structure poreuse, le CTAB étant toujours dans les pores (chapitre 2).

- i) CTAB + NaOH
- ii) TEOS
- iii) pH = 7,5 – 24h

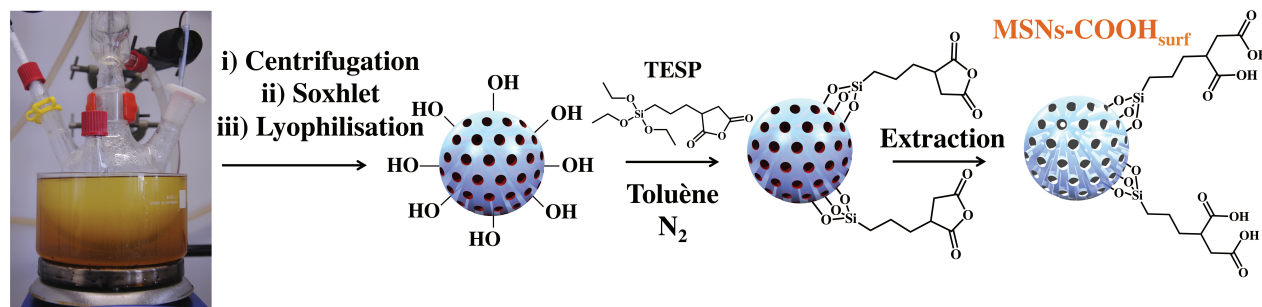


FIGURE 3.19 : Schéma récapitulatif du greffage de la surface des MSNs par des acides carboxyliques. Le greffage est réalisé en très large excès de silane, à savoir 5 molécules de TESP/ nm^2 et en considérant la surface externe égale à 100 m^2/g (estimée en utilisant la méthode *t*-plot [460]).

Les particules ont été ensuite fonctionnalisées par l'anhydride (3-triméthoxysilyl)propylsuccinique (TESP) en se basant sur les méthodes traditionnellement utilisées pour les matériaux mésoporeux [419, 461]. Dans une procédure typique, 150 mg de poudre lyophilisée sont placées dans un tube de Schlenk puis dégazées à 100 °C sous vide dynamique pendant 12 heures afin d'éliminer toutes les traces résiduelles d'eau. Puis, les particules sont redispersées sous N_2 dans 15 mL de toluène fraîchement distillé (10% (m/v) de MSNs) et 34 μL de TESP (120 μmol) sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel. Après 24 heures de réaction sous forte agitation et sous N_2 statique, les particules sont lavées abondamment à l'éther diéthylique et au dichlorométhane (v/v : 1/1) puis séchées à 60 °C pendant une nuit. L'extraction en milieu alcoolique et en présence de nitrate d'ammonium est réalisée quatre fois (cf. chapitre 2). L'éthanol est ensuite évaporé en plaçant la suspension sous vide dynamique. Dans la suite du manuscrit, ces particules seront nommées **MSNs-COOH_{surf}**.

3.2. Greffage de polymères à la surface externe des MSNs

3.2.1.3 Procédure de greffage des polymères à la surface des MSNs-COOH_{surf}

Le greffage du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ et de la PEI₁₈₀₀ en surface des MSNs-COOH_{surf} est réalisé par couplage peptidique, méthode traditionnellement utilisée en biologie pour le couplage des acides aminés [462] et depuis peu adaptée aux nanoparticules [463, 464]. Habituellement, ce couplage est optimal lorsqu'il a lieu en milieu tamponné (pH 7-8), salin (150 mM NaCl) et en présence d'agents de couplage comme l'EDC et l'NHS dont les formules sont présentées sur la Figure 3.20. Le mécanisme réactionnel impliquant les deux agents de couplage étant bien connu [465, 466], nous ne le détaillerons pas ici. Bien qu'il soit conseillé de travailler en milieu tamponné (PBS), nous ne le ferons pas car les particules ne sont pas stables dans ce milieu, ce qui ne garantit pas l'homogénéité du greffage sur les particules individuelles, et de ce fait, leur redispersion. Une représentation schématique du couplage peptidique est présentée sur la Figure 3.20.

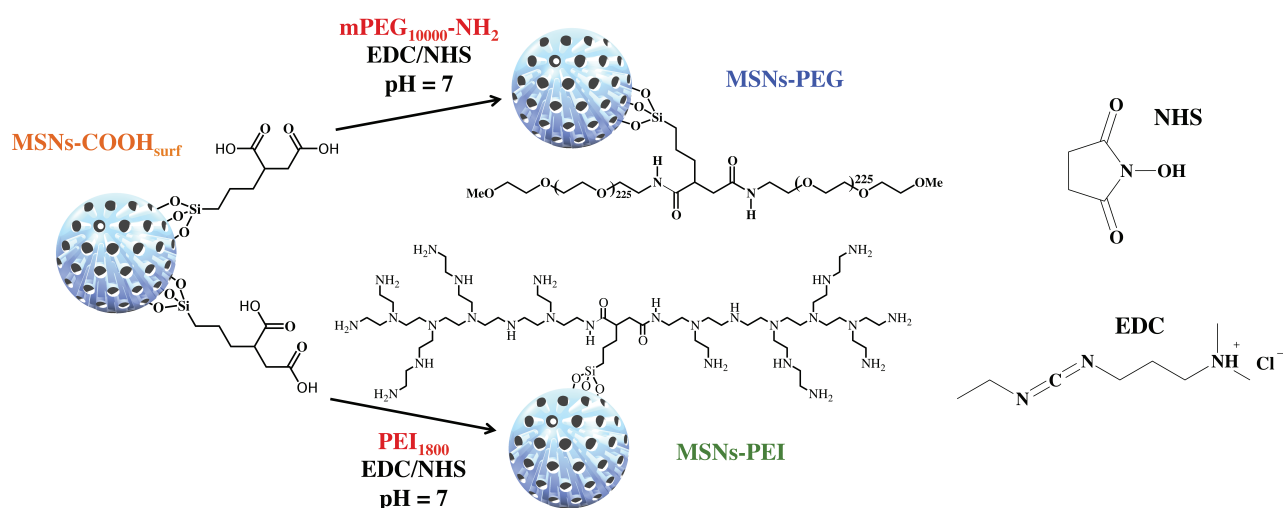


FIGURE 3.20 : Schéma récapitulatif du greffage du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ et de la PEI₁₈₀₀ en surface des MSNs-COOH_{surf} après extraction. Formules chimiques de l'EDC et de l'NHS. Les rapports molaires sont les suivants : 1COOH/5PEI₁₈₀₀ ou 5mPEG₁₀₀₀₀-NH₂/10NHS/10EDC.

Dans une procédure typique, les rapports molaires entre les différents composés chimiques sont les suivants : 1COOH/5PEI₁₈₀₀ ou 5mPEG₁₀₀₀₀-NH₂/10NHS/10EDC. Prenons l'exemple du couplage des MSNs-COOH_{surf} avec la PEI₁₈₀₀. Premièrement, 100 mg de NHS sont dissous dans quelques gouttes de DMSO. Après solubilisation, 5 mL d'eau ultra-pure sont ajoutés au milieu réactionnel. Puis, 160 mg d'EDC dissous dans 5 mL d'eau ultrapure sont rajoutés au mélange. Ensuite, 10 mL d'une suspension de MSNs-COOH_{surf} (15% (m/v), pH = 7) préalablement dispersées aux ultrasons sont ajoutés à la solution d'EDC et d'NHS. Pour finir, 450 mg d'une solution de PEI à 50% (m/m) préalablement diluée dans 5 mL d'eau sont additionnés au milieu. Après 24 heures de réaction à température ambiante et sous agitation vigoureuse, les particules sont lavées à l'eau déminéralisée et placées sous vide dynamique afin d'éliminer les traces résiduelles d'eau. Dans la suite de ce manuscrit, les particules seront nommées **MSNs-PEG** et **MSNs-PEI**, respectivement.

3.2.2 Caractérisation morphologique des MSNs fonctionnalisées

Dans la Tableau 3.9, les diamètres hydrodynamiques moyens (d_{DDL}) des particules MSNs- $\text{COOH}_{\text{surf}}$, MSNs-PEG et MSNs-PEI sont indiquées et comparées aux valeurs moyennes obtenues par comptage MET ($d_{\text{MET ext.}}$). Les clichés de microscopie des particules fonctionnalisées sont données sur la Figure 3.21.

TABEAU 3.9 : *Diamètres hydrodynamiques moyens (d_{DDL}) et tailles obtenues par comptage MET ($d_{\text{MET ext.}}$) des particules fonctionnalisées avec le TESP, le PEG et la PEI. Sel de fond : $\text{NaCl } 10^{-3} \text{ M}$.*

Particules	MSNs _{ext}	MSNs- $\text{COOH}_{\text{surf}}$	MSNs-PEG	MSNs-PEI
d_{DDL} (nm)	221	203	197	224
PDI	0,23	0,10	0,05	0,22
$d_{\text{MET ext.}}$ (nm)	130	142	139	144
c_v	0,20	0,14	0,15	0,17

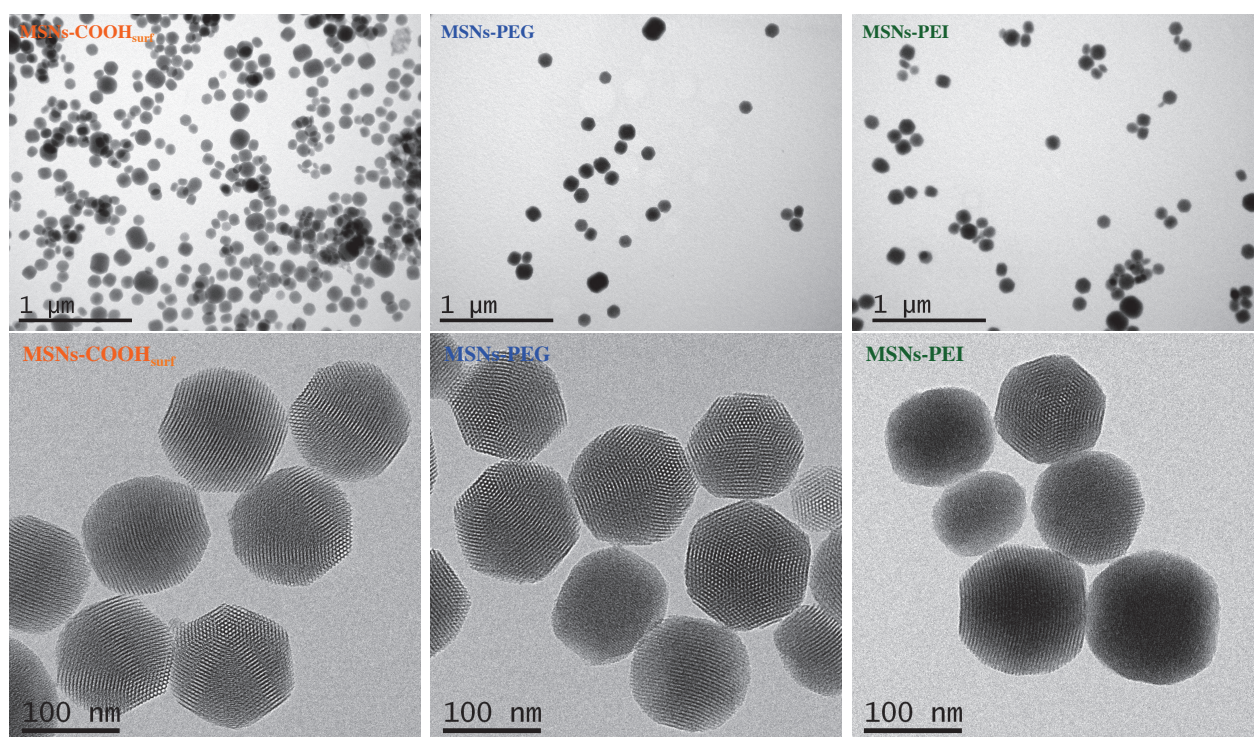


FIGURE 3.21 : *Clichés MET après extraction des particules fonctionnalisées MSNs- $\text{COOH}_{\text{surf}}$, MSNs-PEI et MSNs-PEG.*

Par rapport aux MSNs non fonctionnalisées (MSNs_{ext}), la taille obtenue par microscopie des nanoparticules fonctionnalisées avec le TESP augmente légèrement et est égale à environ 140 nm. Lorsque les polymères sont greffés, la taille MET ne change pas. La différence de taille entre les particules MSNs_{ext} et les particules MSNs- $\text{COOH}_{\text{surf}}$ s'explique par le fait que lors de l'étape de purification par soxhlet les petites particules sont éliminées (elles passent à travers le filtre). Ceci est confirmé par la diminution du coefficient de variation c_v . En revanche, le diamètre hydrodynamique moyen des MSNs- $\text{COOH}_{\text{surf}}$ est plus petit que celui des MSNs_{ext} car les particules sont mieux dispersées grâce à la présence des groupements carboxyliques en

surface (voir paragraphe 3.2.3).

En règle générale, il est observé qu'après le greffage de PEG en surface des particules, le diamètre hydrodynamique augmente légèrement [467]. Dans notre cas, le diamètre hydrodynamique n'évolue pas tandis que l'indice de polydispersité diminue. Cette tendance peut être corrélée à l'état d'agrégation observé sur les clichés de microscopie (Figure 3.21). En effet, les particules MSNs-PEG semblent mieux dispersées que les particules MSNs-COOH_{surf}.

Après le greffage de la PEI, le diamètre hydrodynamique et l'indice de polydispersité augmentent. Etant donné que le diamètre obtenu par MET n'augmente pas, les particules sont très probablement moins bien dispersées en solution, ce qui est confirmé par l'état de dispersion des particules sur les clichés MET (Figure 3.21). Contrairement au mPEG-NH₂ qui ne possède qu'une terminaison potentiellement réactive avec les acides carboxyliques, la PEI utilisée est un polymère branché comportant des sites multiples d'accrochage qui peuvent réagir avec deux acides carboxyliques présents sur deux particules voisines, permettant ainsi la formation de « ponts » entre deux particules.

3.2.3 Caractérisation par zétamétrie des propriétés électrocinétiques des MSNs greffées

Afin de s'assurer que les groupements chimiques sont bien présents à la surface externe des MSNs fonctionnalisées, des mesures de potentiel zêta en fonction du pH ont été effectuées. Les résultats sont reportés sur la Figure 3.22.

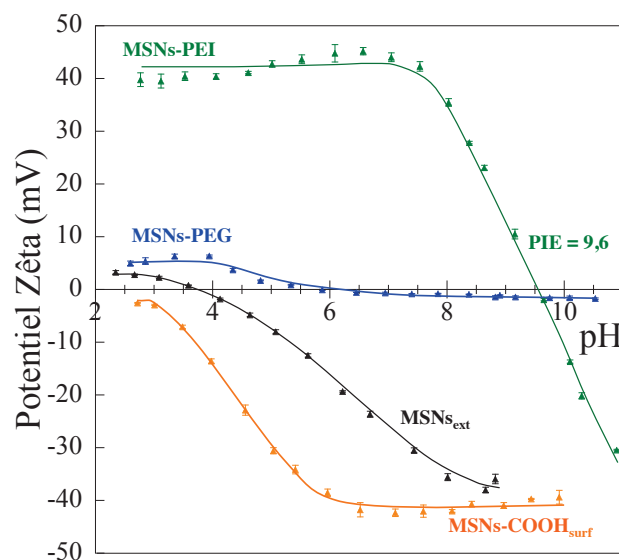


FIGURE 3.22 : Potentiel Zêta des nanoparticules fonctionnalisées ou non en fonction du pH. Les courbes servent de guide pour les yeux. Sel de fond : $[NaCl] = 10^{-2}$ M.

Pour une même valeur de pH, les particules MSNs-COOH_{surf} sont chargées plus négativement que les MSNs non fonctionnalisées, ce qui confirme la présence des groupements carboxyliques en surface des nanoparticules.

Pour les particules MSNs-PEI, la courbe montre un point isoélectrique aux alentours de 9,6, ce qui est cohérent avec les descriptions faites dans la littérature [13, 60, 468]. A pH inférieur à 9,6, les particules MSNs-PEI présentent un potentiel zêta positif et très élevé car la densité des sites protonables du polymère est supérieure à celle des particules MSNs_{ext}. Il reste donc beaucoup de fonctions amines disponibles. Au-delà de pH 10, le potentiel zêta est très négatif et très élevé. Deux raisons peuvent expliquer ce résultat. A ces pH basiques, la dissolution de la silice en surface peut induire une libération de la PEI et la surface des particules ressemble alors à celles des particules non fonctionnalisées. Toutefois, ces titrages sont effectués en continu, ce qui laisse peu de temps pour que les particules se dissolvent en surface. Dans l'autre hypothèse, les fonctions amines sont déprotonées et neutre au-delà de pH 10,7 ($pK_{a1} = 10,7$), le potentiel zêta négatif peut s'expliquer par la déprotonation des sites silanols qui restent libres à la surface.

Pour les particules MSNs-PEG, le potentiel zêta est proche de 0 mV, et ce, quel que soit le pH. Cela montre que le polymère est présent à la surface des particules et qu'il masque toutes les charges présentes à la surface des particules. Cet « écrantage » des charges peut empêcher l'agglomération importante des nanoparticules en milieu physiologique.

Pour conclure, la caractérisation des MSNs fonctionnalisées par zétamétrie permet de mettre en évidence que les groupements carboxyliques et les polymères sont présents à la surface des nanoparticules.

3.2.4 Caractérisation de la structure poreuse des MSNs fonctionnalisées

Les isothermes de sorption de N₂ et les diffractogrammes des particules fonctionnalisées par le TESP et les deux polymères sont indiquées sur la Figure 3.23. Les propriétés texturales et structurales des particules fonctionnalisées ou non sont présentées dans le Tableau 3.10.

Le diffractogramme des particules MSNs-COOH_{surf} présente quatre réflexions (100), (110), (200) et (210) caractéristiques d'un arrangement hexagonal 2D. Les diffractogrammes des particules fonctionnalisées par le PEG et la PEI présentent seulement trois réflexions (100), (110) et (200). Par rapport aux particules MSNs-COOH_{surf}, les réflexions (210) et (300) ont disparu des diffractogrammes. De plus, l'intensité du pic correspondant au plan (110) a diminué, ce qui peut vouloir dire que l'ordre à longue distance a été légèrement altéré. Néanmoins, on peut en conclure que le greffage de la surface externe des MSNs par le TESP et les polymères n'a pas modifié la mésostructure.

Une isotherme réversible de type IV typique des matériaux de type MCM-41 est observée pour les trois échantillons. Par rapport aux MSNs non fonctionnalisées (voir Figure 3.5), l'étape de condensation capillaire caractéristique de la mésoporosité a lieu pour des pressions relatives légèrement plus faibles, c'est-à-dire à $P/P_0 < 0,3$, indiquant que la taille des pores a diminué. Les isothermes des particules MSNs-PEG et MSNs-PEI montrent que cette étape a lieu pour des pressions relatives beaucoup plus faibles que pour les particules MSNs-COOH_{surf}, *i.e.* pour

3.2. Greffage de polymères à la surface externe des MSNs

des pressions relatives P/P_0 d'environ 0,2, ce qui indique une diminution de la taille des pores. Pour ces deux échantillons, la quantité d'azote adsorbée est inférieure d'un facteur trois par rapport à celle des particules non-greffées ($MSNs_{ext}$).

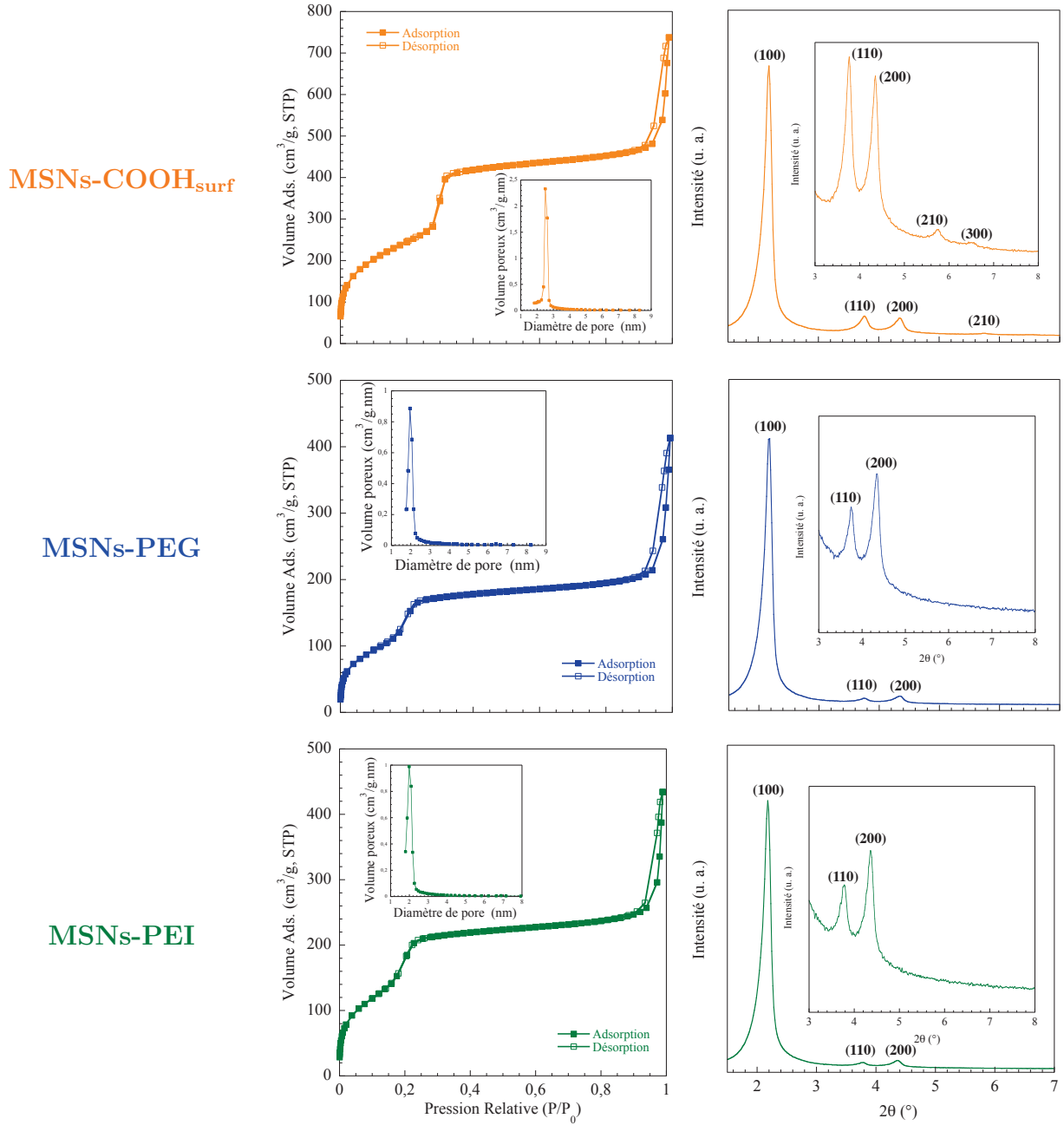


FIGURE 3.23 : Isothermes, distributions de taille des pores et diffractogrammes des $MSNs-COOH_{surf}$, $MSNs-PEI$ et $MSNs-PEG$.

Par rapport aux MSNs non fonctionnalisées, la distance centre à centre a_0 des particules fonctionnalisées a légèrement diminué mais correspond à la distance centre à centre a_0 déterminée pour les particules après l'extraction par soxhlet. La diminution significative du volume poreux V_m , de la surface spécifique S_{BET} et du diamètre des pores D_p tend à montrer que soit une partie des pores n'est plus accessible, soit certains pores ont été obstrués de manière partielle. Pour les particules $MSNs-COOH_{surf}$, la diminution du volume poreux, de la surface spécifique

et du diamètre des pores tend à prouver que la fonctionnalisation n'a pas seulement eu lieu à l'extérieur des particules mais aussi à l'intérieur des canaux. Cette hypothèse est d'autant plus probable qu'après une extraction soxhlet de 24 heures, la surface spécifique est de 560 m²/g et 24% du CTAB a été éliminé².

TABLEAU 3.10 : Propriétés structurales et texturales des particules $MSNs_{ext}$, $MSNs-COOH_{surf}$, $MSNs-PEG$ et $MSNs-PEI$. La surface spécifique et le volume poreux sont donnés en fonction de la masse totale d'échantillon.

Échantillon	a_0 (nm)	S_{BET} (m ² /g)	V_m (cm ³ /g)	D_p (nm)
$MSNs_{ext}$	4,85	1062	0,96	2,8
$MSNs-COOH_{surf}$	4,70	904	0,75	2,6
$MSNs-PEG$	4,74	455	0,31	2,2
$MSNs-PEI$	4,68	580	0,39	2,1

3.2.5 Analyse quantitative du taux de greffage

3.2.5.1 Méthode de détermination du taux de greffage par analyse élémentaire

Le taux de greffage expérimental $\tau_{exp.}$ est calculé soit en mmol/g d'échantillon (calculé comme précédemment), soit en molécules/nm² déterminé à partir du pourcentage expérimental (%X) de l'élément X, comme le montre l'équation suivante :

$$\tau_{exp.} (molécules/nm^2) = \left(\frac{\%X}{M_X \times 100} \right) \times \frac{10^3}{n_X} \times \left(\frac{N_A}{S_A \times 10^{18}} \right) \quad (3.7)$$

avec X l'élément considéré, M_X sa masse molaire, n_X le nombre d'atomes de X dans la chaîne du greffon, N_A le nombre d'Avogadro. Pour les particules $MSNs-COOH_{surf}$, c'est l'élément carbone qui est considéré. Le taux de greffage est calculé en retranchant le taux de carbone des particules non fonctionnalisées ($MSNs_{ext}$). La surface spécifique considérée (S_A) est celle de l'échantillon après 24 heures d'extraction soxhlet, c'est à dire 560 m²/g. Le facteur 10¹⁸ vient de la transformation du taux de greffage en molécules/nm².

Pour les particules $MSNs-PEG$, c'est l'élément carbone qui est considéré. Le taux de greffage est calculé en retranchant le taux de carbone des particules $MSNs-COOH_{surf}$. Le nombre de carbone par chaîne de PEG est calculé en considérant le PEG sous sa forme $(CH_2-CH_2-O)_n$, soit 455 carbones/chaîne de PEG. Pour les particules $MSNs-PEI$, c'est l'élément azote qui est considéré. Le nombre d'azote par chaîne de PEI est calculé en considérant la PEI sous sa forme $(CH_2-CH_2-NH)_n$, soit 42 azotes/chaîne de PEI. Pour ces deux échantillons, la surface spécifique considérée (S_A) est la surface spécifique externe qui est égale à 100 m²/g.

2. Déterminé par Analyse ThermoGravimétrique.

3.2.5.2 Méthode de détermination du taux de greffage par analyse thermogravimétrique

Des analyses thermogravimétriques ont été effectuées sur les poudres MSNs-COOH_{surf}, MSNs-PEI et MSNs-PEG. Sur la Figure 3.24, les courbes ATG des particules non fonctionnalisées (MSN_{ext}) et des particules fonctionnalisées en « surface » par le TESP sont présentées afin de décrire la démarche utilisée pour quantifier le taux de fonctionnalisation.

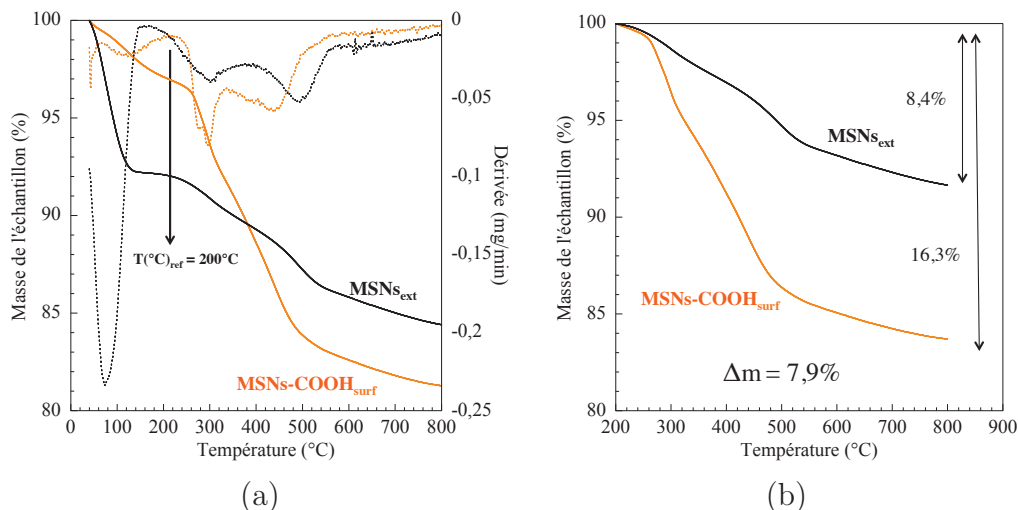


FIGURE 3.24 : Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons MSNs_{ext} (noir) et MSNs-COOH_{surf} (orange). Pour la détermination du taux de greffage, la température à laquelle les pertes de masse sont soustraites est 200 °C (T_{ref} sur le graphique). Les pertes de masse sont exprimées soit en fonction de la masse initiale de l'échantillon (a), soit en fonction de la masse à 200 °C (b).

Par rapport au MSNs_{ext}, la courbe ATG des particules MSNs-COOH_{surf} montre que la perte de masse due à la présence d'eau physisorbée, qui a lieu avant 150 °C, est plus faible que pour les particules non fonctionnalisées d'environ 6%. Ceci peut s'expliquer soit par la présence des groupements carboxyliques à l'entrée des canaux rendant l'accessibilité des molécules d'eau à la porosité limitée, soit par une diminution des groupements silanols de surface avec la fonctionnalisation. La perte de masse apparente avant 200 °C est probablement liée à la formation de l'anhydride succinique [164]. Entre 200 °C et 550 °C, une perte de masse importante d'environ 14,3% est observée et peut être assimilée au départ du silane (rupture de la liaison Si-C) et à la déshydroxylation. Au-delà de 200 °C, la perte de masse Δm est de 7,9%, par rapport aux particules non-fonctionnalisées.

Pour les particules MSNs-PEI, la courbe ATG est comparée à celle des particules MSNs-COOH_{surf} (Figure 3.25). La courbe ATG des particules MSNs-PEI montre qu'une importante perte de masse a lieu dès 120 °C et est assimilable à la perte de masse de l'eau fortement liée à la PEI. A partir de 150 °C, la perte de masse correspond à la décomposition sous air de la PEI [469, 470]. Afin d'obtenir la quantité de PEI qui est greffée sur les acides carboxyliques, la perte de masse entre 70 °C (T_{ref}) et 800 °C de l'échantillon MSNs-COOH_{surf} est soustraite à celle calculée pour l'échantillon MSNs-PEI dans le même domaine de température. Cette différence

de perte de masse Δm est égale à 15,0%. Dans ce calcul, la quantité d'eau chimisorbée et libérée par la formation de l'anhydride succinique est considérée comme étant la même pour les deux échantillons.

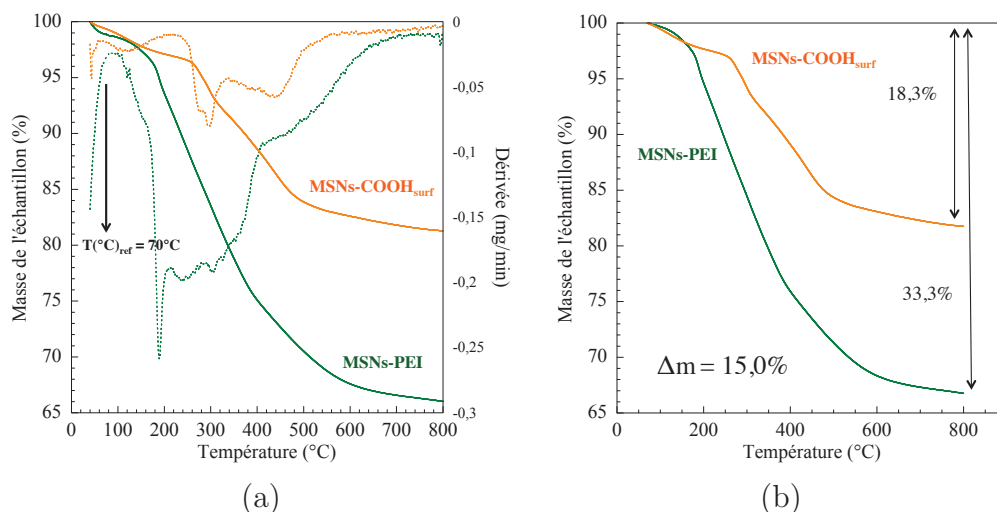


FIGURE 3.25 : Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons $\text{MSNs-COOH}_{\text{surf}}$ (orange) et MSNs-PEI (vert). La température pour la soustraction des pertes de masse est fixée à 70°C (T_{ref} sur le graphique). Pertes de masse exprimées en fonction de la masse initiale de l'échantillon (a) ou en fonction de la masse à 70°C (b).

Pour déterminer la quantité de PEG greffée sur les acides carboxyliques, la même procédure est adoptée. Sur la Figure 3.26, les courbes ATGs des $\text{MSNs-COOH}_{\text{surf}}$ et MSNs-PEG sont présentées. L'analyse ATG des particules MSNs-PEG montre qu'une perte de masse d'environ 4% a lieu aux alentours de 150°C et est attribuable à la perte de masse de l'eau physisorbée sur le polymère. A partir de 220°C, une perte de masse d'environ 31% est observée et correspond à la dégradation du PEG [223, 471]. Entre 200°C (T_{ref}) et 800°C, la différence des pertes de masse Δm des échantillons MSNs-PEG et $\text{MSNs-COOH}_{\text{surf}}$ est égale à 17,0%.

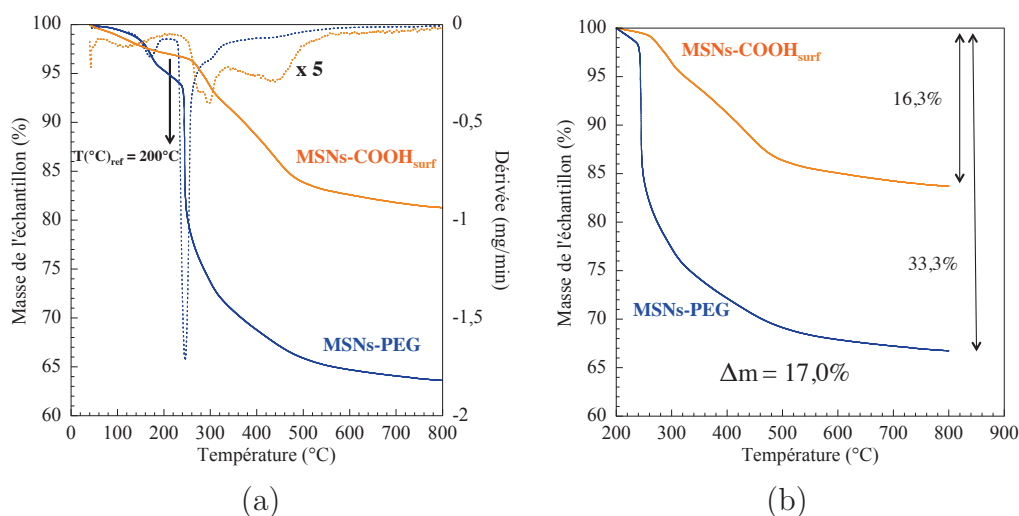


FIGURE 3.26 : Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons $\text{MSNs-COOH}_{\text{surf}}$ (orange) et MSNs-PEG (bleu). La température pour la soustraction des pertes de masse est fixée à 200°C (T_{ref} sur le graphique). Pertes de masse exprimées en fonction de la masse initiale de l'échantillon (a) ou en fonction de la masse à 200°C (b).

3.2. Greffage de polymères à la surface externe des MSNs

De la même façon que dans la partie précédente, le taux de greffage $\tau_{\text{exp.}}$ est calculé soit en mmol/g, soit en molécules/nm² à partir de la différence de perte de masse Δm , comme le montre l'équation suivante :

$$\tau_{\text{exp.}}(\text{molécules/nm}^2) = \left(\frac{\Delta m}{M_{\text{greffon}}} \right) \times \left(\frac{N_A}{S_A \times 10^{20}} \right) \quad (3.8)$$

où M_{greffon} est la masse molaire du greffon organique perdu dans l'intervalle de température considéré, N_A le nombre d'Avogadro et S_A la surface spécifique considérée (voir partie analyse élémentaire). Les masses molaires seront indiquées dans la section suivante. Le facteur 10^{20} vient de la transformation du taux de greffage en molécules/nm².

3.2.5.3 Résultats et discussion

Dans le Tableau 3.5, les taux de greffage expérimentaux déterminés par ATG et AE sont donnés. Les pourcentages massiques des éléments N, C et H ainsi que les pertes de masse Δm sont également indiqués.

TABLEAU 3.11 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par AE et ATG. Pour le PEG et le PEI, les masses molaires des greffons sont considérées comme étant celle des masses molaires des produits brutes. Les surfaces spécifiques considérées afin d'exprimer les taux de greffage en molécules/nm² correspondent à la surface externe pour les particules MSNs-PEI et MSNs-PEG (100 m²/g) et à la surface spécifique d'un échantillon non fonctionnalisé après 24 heures d'extraction soxhlet pour les MSNs-COOH_{surf}. ^aT_{ref.} : température de départ pour la détermination des pertes de masse Δm .

AE					
Échant.	N (%)	C (%)	H (%)	$\tau_{\text{exp.}}$ (mmol/g)	$\tau_{\text{exp.}}$ (molécules/nm ²)
MSNs _{ext}	0,0	4,3	1,3	-	-
MSNs-COOH _{surf}	0,0	10,1	3,0	0,69	1,48COOH
MSNsPEI	7,2	16,7	3,2	0,12	0,74PEI
MSNs-PEG	1,3	18,1	2,7	0,02	0,09PEG
ATG					
Échant.	T _{ref.} ^a (°C)	Δm (%)	M _{greffon} (g/mol)	$\tau_{\text{exp.}}$ (mmol/g)	$\tau_{\text{exp.}}$ (molécules/nm ²)
MSNs-COOH _{surf}	200	7,9	141	0,56	1,21COOH
MSNsPEI	70	15,0	1800	0,08	0,50PEI
MSNs-PEG	200	17,0	10000	0,02	0,10PEG

Pour les échantillons MSNs-COOH_{surf} et MSNs-PEG, les taux de greffage expérimentaux déterminés par AE et ATG sont proches. En revanche, le taux expérimental déterminé par ATG pour les particules MSNs-PEI est sous-estimé par rapport à celui déterminé par AE dans la mesure où la soustraction des pertes de masse à cause de leur superposition est peu précise. Pour les MSNs-COOH_{surf}, le taux de fonctionnalisation est de 1,48COOH/nm², ce qui est proche des taux de greffage de silanes en surface des nanoparticules décrits dans la littérature (compris entre 0,06 et 1,8 groupements/nm²) [170, 472].

Par rapport à la quantité de groupements carboxyliques, le nombre de chaînes de PEG greffées en surface est très faible puisqu'environ 6% des fonctions carboxyliques ont été greffées. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le PEG utilisé (PEG de masse molaire 10 KDa) induit un encombrement stérique limitant l'accroche d'un nombre plus important de PEG. En effet, Cauda *et al.* ont montré que la proportion de PEG en surface était inversement proportionnelle à la longueur de chaîne de PEG à cause des gênes stériques engendrées par les polymères de fortes masses molaires [223]. En revanche, les particules greffées avec la PEI présentent un taux de greffage plus important et égal à environ 0,70PEI/nm², probablement parce que ce polymère possède de nombreux sites d'accroche et qu'il génère moins de gêne stérique.

3.2.6 Caractérisations spectroscopiques des MSNs fonctionnalisées

Dans le but de montrer que le TESP n'est pas seulement adsorbé mais bien greffé à la surface des nanoparticules, les particules MSNs-COOH_{surf} ont été caractérisées par spectroscopie RMN ²⁹Si à l'état solide et spectroscopie FT-IR. Afin de savoir si le greffage des polymères à la surface des MSNs-COOH_{surf} était bien de nature covalente, les particules MSNs-PEI et MSNs-PEG ont été aussi caractérisées par spectroscopie infrarouge.

3.2.6.1 Spectroscopies FT-IR et RMN ²⁹Si à l'état solide des particules MSNs-COOH_{surf}

Le spectre RMN ²⁹Si à l'état solide en polarisation croisée des particules modifiées par le TESP est donnée sur la Figure 3.27(a). Une représentation schématique des configurations de recouvrement du silane avec les différentes unités T^m correspondantes est indiquée sur la Figure 3.27(b). Les contributions Qⁿ et T^m calculées à partir des déconvolutions des pics obtenues en simple impulsion sont données dans le Tableau 3.12.

Le spectre RMN ²⁹Si en polarisation croisée des particules MSNs-COOH_{surf} présentent en plus des résonances Q⁴ (-110 ppm), Q³ (-100 ppm) et Q² (-90 ppm) caractéristiques du réseau silicique, trois résonances supplémentaires relatives aux entités T¹ (-48 ppm), T² (-57 ppm) et T³ (-65 ppm) caractérisant le greffage du TESP aux groupements silanols de surface.

Une diminution du pourcentage des espèces Q³ et/ou Q² et donc une augmentation des espèces Q⁴, indiquant une diminution de la teneur en silanols, est observée avec la fonctionnalisation (Tableau 3.12). Ce résultat est concomitant avec l'apparition des espèces T^m qui montre que le greffage est effectif et qu'il se fait sur les deux types de groupements silanols de surface (Q³ et Q²). Par rapport à l'échantillon non fonctionnalisé, le rapport $\sum(\text{Si-OH})/\sum\text{Si}$ est en accord avec les résultats obtenus précédemment par ATG (diminution de la perte d'eau physisorbée de 6%). La spectroscopie FT-IR (Figure 3.28) corrobore également ces résultats puisqu'il semble que le nombre de silanols soit inférieur à celui des MSNs non fonctionnalisées (diminution de la bande de vibration entre 3600 et 3400 cm⁻¹).

3.2. Greffage de polymères à la surface externe des MSNs

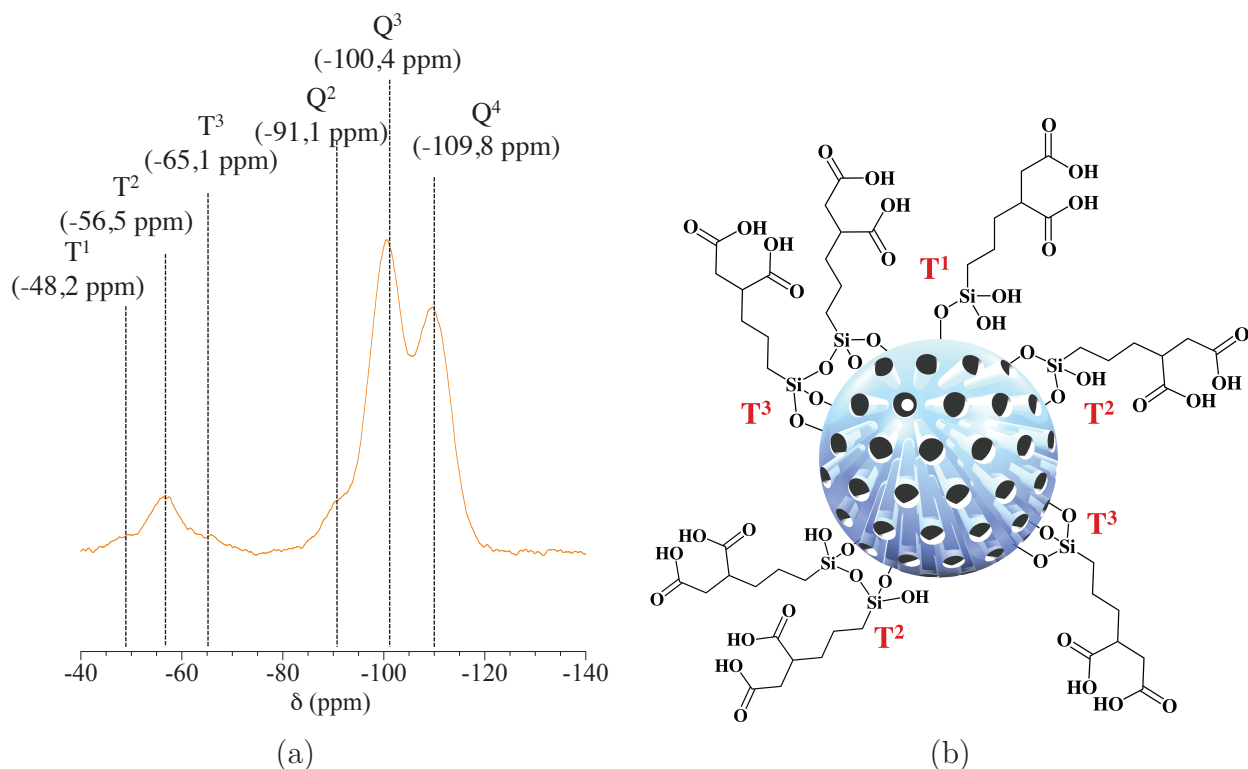


FIGURE 3.27 : (a) Spectre RMN ^{29}Si MAS en polarisation croisée des particules fonctionnalisées par le TESP et (b) configurations des recouvrements possibles du silane en surface des particules. Les représentations schématiques des différentes unités T^m (liste non-exhaustive) sont indiquées. Les mesures ont été réalisées sur l'échantillon avant extraction.

TABLEAU 3.12 : Pourcentages respectifs des espèces Q^n et T^m des particules $\text{MSNs-COOH}_{\text{surf}}$. Les décompositions des spectres RMN réalisées dans le but de déterminer la proportion des espèces ont été effectuées avec le logiciel DMfit [357]. Le pourcentage d'erreur est d'environ 5%. Les positions sont déterminées à partir du spectre réalisé en polarisation croisée.

Échant.	$^N Q^4$ (%)	$^N Q^3$ (%)	$^N Q^2$ (%)	T^3 (%)	T^2 (%)	T^1 (%)	$\sum(\text{Si-OH})/\sum\text{Si}$	$\sum(\text{Si-C})/\sum\text{Si}$
MSNs	57	36	7	0	0	0	0,50	0
MSN-COOH _{surf}	64	33	3	0,2	2,8	0,4	0,41	0,03

^NAfin de pouvoir comparer les matériaux entre eux, une normalisation a été effectuée : la somme des espèces Q^n est ramenée à 100%. $\sum(\text{Si-OH})/\sum\text{Si} = \sum(Q^3 + 2Q^2 + T^2 + 2T^1)/\sum(Q^n + T^m)$ et $\sum(\text{Si-C})/\sum\text{Si} = \sum T^m/(T^m + Q^n)$ [437] en prenant les valeurs des Q^n sans normalisation.

Les spectres infrarouges de la Figure 3.28 sont similaires à ceux obtenus pour les particules $\text{MSNs-COOH}_{\text{rod}}$ en section 3.1.6.4. En effet, la présence des bandes caractéristiques des fonctions carboxyliques ou succiniques anhydrides (en augmentant la température) montre que le greffage par le TESP a bien donné lieu à des nanoparticules possédant des fonctions carboxyliques [164, 450, 451].

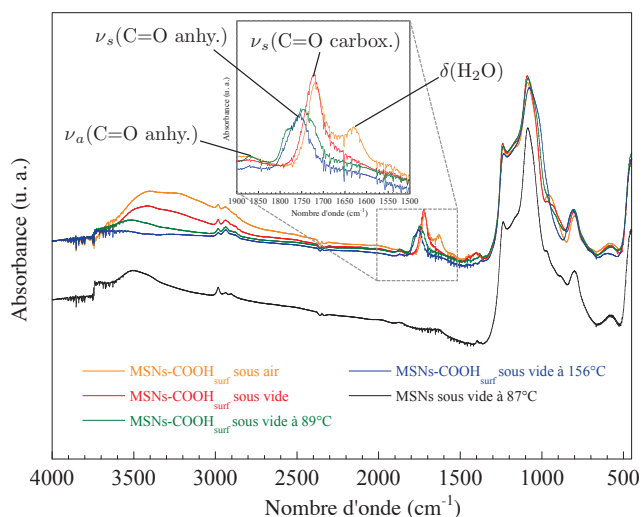


FIGURE 3.28 : Spectres infrarouges expérimentaux des particules $MSNs-COOH_{surf}$ sous air et sous vide à différentes températures.

3.2.6.2 Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-PEI

Sur la Figure 3.29, les spectres des $MSNs-COOH_{surf}$ et $MSNs-PEI$, tous deux réalisés sous vide dynamique sont présentés. Le spectre de la PEI seule réalisé en dispersant la solution de PEI à 50% (m/m) dans du KBr est aussi indiqué.

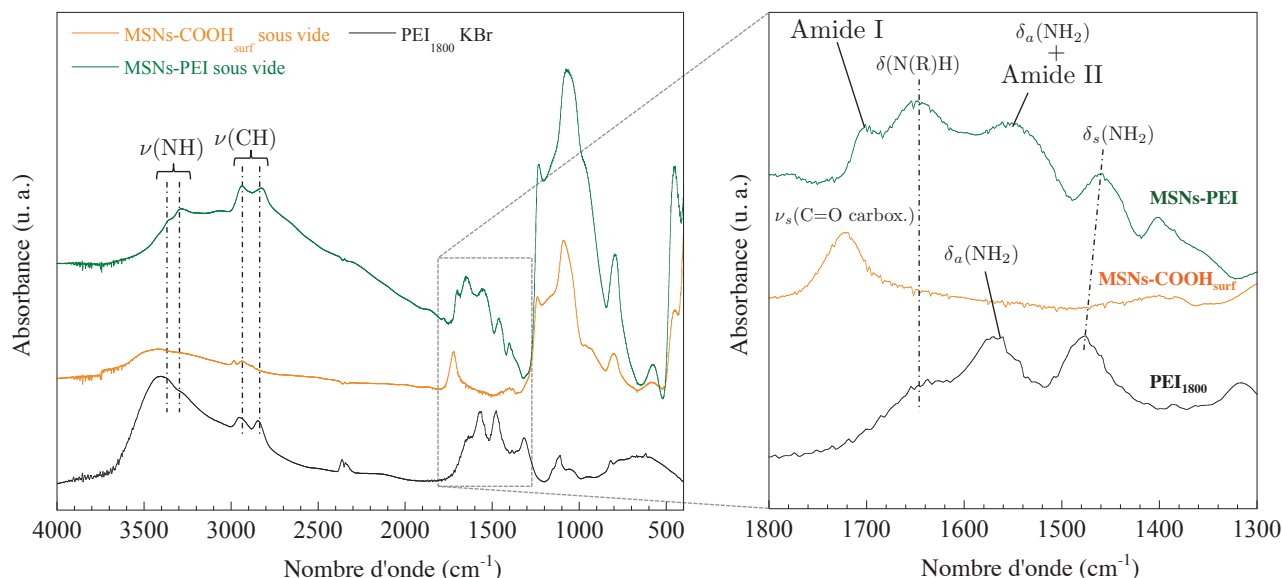


FIGURE 3.29 : Spectres infrarouges expérimentaux des particules $MSNs-COOH_{surf}$ (courbe orange) et $MSNs-PEI$ (courbe verte) réalisés après 1 nuit sous vide dynamique et spectre d'une solution de PEI à 50% (m/m) dispersée dans du KBr (courbe noire).

Le spectre des particules $MSNs-PEI$ de la Figure 3.29 révèle la présence des bandes caractéristiques de la silice pour des nombres d'onde $\bar{\nu}$ compris entre 400 et 1300 cm^{-1} , ainsi que les bandes de vibration caractéristiques de la PEI à 3289, 3357, 2846 et 2938 cm^{-1} . Ces bandes correspondent respectivement aux vibrations d'élongation symétrique et asymétrique ($\nu(CH)$ et $\nu(NH)$) des liaisons N-H et C-H des groupements CH_2 et NH_2 [470]. La présence de ces bandes montre que le polymère est bien présent au sein des nanoparticules.

3.2. Greffage de polymères à la surface externe des MSNs

Entre 1800 et 1300 cm^{-1} , le spectre des particules MSNs-PEI montre trois autres bandes de vibration caractéristiques de la PEI. Elles sont positionnées à 1464, 1558 et 1652 cm^{-1} et correspondent respectivement aux vibrations de déformation symétrique $\delta_s(\text{NH}_2)$ et asymétrique $\delta_a(\text{NH}_2)$ de l'amine primaire et à la vibration de déformation $\delta(\text{N}(\text{R})\text{H})$ de l'amine secondaire [447, 469]. Ces bandes sont légèrement décalées par rapport à la PEI seule (1639, 1567 et 1479 cm^{-1} pour la PEI contre 1639, 1558 et 1464 cm^{-1} pour les particules MSNs-PEI). Cela s'explique probablement par le fait que l'environnement de la PEI est différent. Dans un cas, la PEI est en « solution aqueuse » et dans l'autre cas, la PEI est greffée et déshydratée.

Sur le spectre des particules MSNs-PEI, une large bande apparaît à 1558 cm^{-1} et peut être la combinaison de deux bandes : la bande de vibration de déformation asymétrique $\delta_s(\text{NH}_2)$ et la bande de vibration « Amide II ». Cette dernière bande résulte de la combinaison de deux vibrations : la vibration de déformation $\delta(\text{NH})$ et la vibration d'élongation $\nu(\text{NH})$ caractéristiques des amides [473, 474]. De plus, la bande caractéristique de la liaison C=O de l'acide carboxylique disparaît sur le spectre des MSNs-PEI, et une autre bande de vibration est visible à 1700 cm^{-1} . Cette bande correspond à la vibration d'élongation de la liaison C=O d'un amide secondaire et est appelée dans la littérature, la bande « Amide I » [473, 474]. La disparition de la bande caractéristique du groupe carbonyle de l'acide carboxylique permet d'attester que toutes les fonctions carboxyliques ont servi à greffer les chaînes de PEI.

Pour conclure, la présence sur le spectre des particules MSNs-PEI, des bandes de vibration « Amide I » et « Amide II » affirme que la PEI n'est pas adsorbée en surface des particules mais bien greffée de manière covalente en surface des MSNs-COOH_{surf} *via* la formation d'une liaison amide.

3.2.6.3 Spectroscopie FT-IR des particules MSNs-PEG

Sur la Figure 3.30, les spectres infrarouges des particules MSNs-COOH_{surf}, MSNs-PEG et du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ sont présentés pour deux zones spectrales comprises entre les nombres d'onde $\bar{\nu}$ allant de 4000 à 400 cm^{-1} et de 1800 à 800 cm^{-1} (zoom).

Par rapport au spectre des particules MSNs-COOH_{surf}, le spectre des particules MSNs-PEG montre plusieurs pics d'absorption supplémentaires entre 2980 et 2880 cm^{-1} . Ils sont attribués aux vibrations d'élongation $\nu(\text{CH})$ des liaisons CH des groupements CH₂ et CH₃ de la chaîne du polymère. D'autres bandes caractéristiques du polymère sont retrouvées dans le spectre des particules MSNs-PEG, comme par exemple les bandes à 1458 et 1349 cm^{-1} associées respectivement aux vibrations d'élongation des liaisons C-H des groupements CH₂ et du squelette du polymère [223].

Sur le spectre des particules MSNs-PEG, la bande de vibration caractéristique du groupe carbonyle à 1720 cm^{-1} est beaucoup plus large que sur le spectre des particules MSNs-COOH_{surf}. Cet élargissement pourrait être attribué à la présence simultanée de la bande « Amide I » centrée à 1700 cm^{-1} , et de la bande caractéristique de la vibration du groupe carbonyle de

l'acide carboxylique [473, 474]. Ceci pourrait montrer que l'amide a bien été formé, et que par conséquent, le greffage est covalent. Cette hypothèse est corroborée par la présence d'une bande supplémentaire à 1569 cm^{-1} associée à l'« Amide II ».

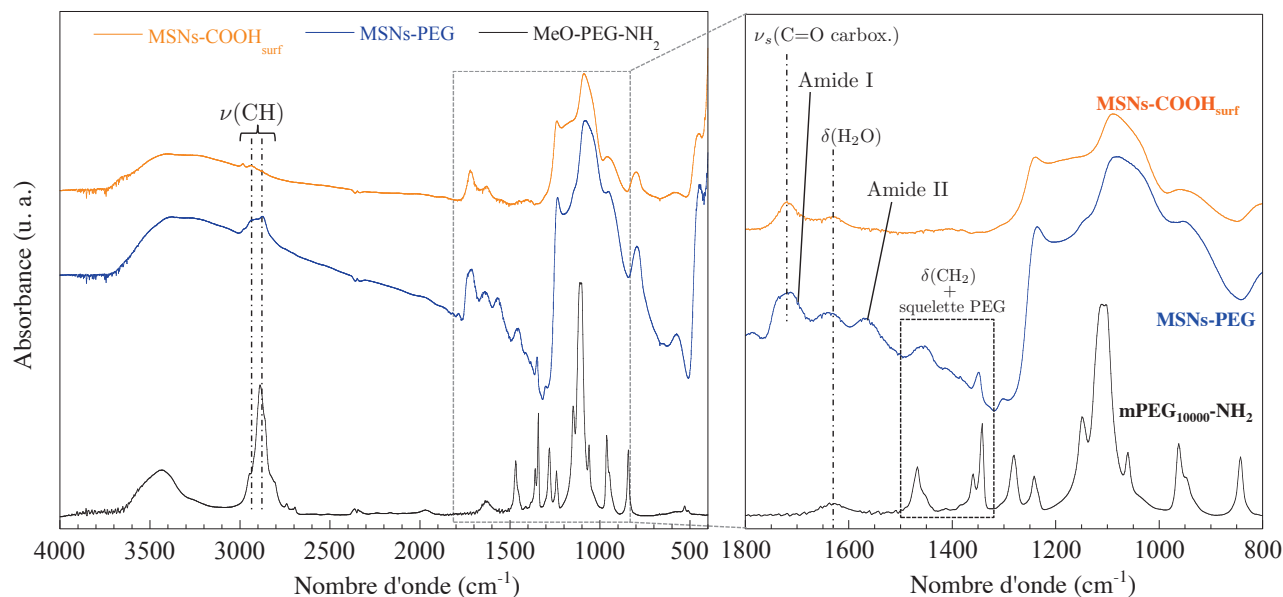


FIGURE 3.30 : Spectres infrarouges expérimentaux des particules MSNs-COOH_{surf} (courbe orange) et des MSNs-PEG (courbe bleue) réalisés sous air et spectre de référence du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ réalisé dans du KBr (courbe noire).

En résumé, la présence des bandes de vibration « Amide I » et « Amide II » permet d'affirmer que le greffage covalent du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ sur les MSNs-COOH_{surf} a bien eu lieu mais, comme nous l'évoquons dans la section 3.2.5.3, concerne seulement une partie des fonctions carboxyliques.

3.2.7 Stabilité des nanoparticules en milieu physiologique

Dans le but de connaître le comportement des particules MSNs-PEG et MSNs-PEI en milieu physiologique, les particules ont été redispersées dans une solution de NaCl à 10^{-3} ou à 0,15 M (force ionique du milieu physiologique) dont la pH a été ajusté à 7. Les diamètres hydrodynamiques ont ensuite été mesurés en fonction du temps.

La Figure 3.31 montre que lorsque les particules pegylées (MSNs-PEG) sont redispersées dans une solution de NaCl à 10^{-3} M, la distribution en taille est très étroite et est centrée à 197 nm. Après plusieurs jours, nous avons montré que cette distribution en taille n'évoluait pas et était toujours centrée à 197 nm. Par conséquent, les particules pegylées sont stables pendant plusieurs jours en milieu faiblement salin. En revanche, dès lors que la force ionique du milieu est plus élevée (NaCl 0,15 M), les particules s'agglomèrent très rapidement. En l'espace d'une mesure (environ 4 minutes), la taille des particules passent de 416 nm à 639 nm (Figure 3.31), ce qui montre ainsi que les particules pegylées **ne sont pas stables en milieu physiologique**. Un comportement similaire a été observé pour les particules polyéthyliminées (MSNs-PEI).

3.3. Etude *in vitro* de la cytotoxicité des MSNs fonctionnalisées sur des cellules cancéreuses

Afin d'améliorer la stabilité des particules en milieu physiologique, plusieurs solutions peuvent être envisagées. Il conviendrait par exemple d'augmenter la densité de greffage en utilisant des polymères dont les longueurs de chaînes sont plus faibles ou encore d'utiliser des polymères dendritiques ou des copolymères peignes [475–477].

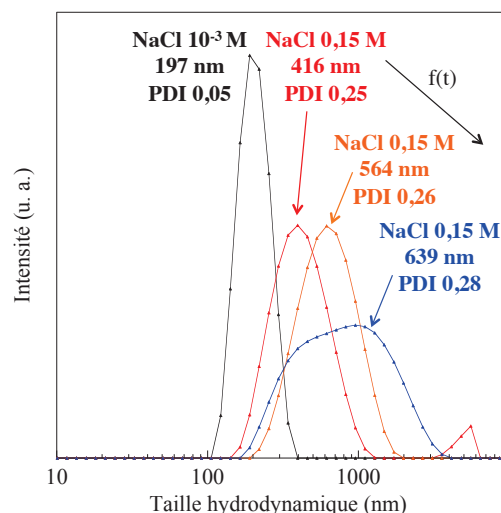


FIGURE 3.31 : Distributions en taille obtenues en diffusion de la lumière dans du NaCl à 10^{-3} M ou NaCl à 0,15 M pour les particules MSNs-PEG.

3.3 Etude *in vitro* de la cytotoxicité des MSNs fonctionnalisées sur des cellules cancéreuses

L'objectif principal de cette étude est de savoir si les MSNs fonctionnalisées sont susceptibles d'altérer les cellules tumorales. Pour cela, des tests de cytotoxicité ont été effectués sur des cellules en culture afin de vérifier leur innocuité.

3.3.1 Préparation des échantillons

Les tests de cytotoxicité ont été réalisés sur la même lignée cellulaire SW480 et en utilisant le même protocole de préparation des échantillons que celui déjà exposé dans le chapitre 2. Les différentes nanoparticules testées sont les suivantes : MSNs-SH, MSNs-NH₂, MSNs-COOH_{sph}, MSNs-COOH_{rod}, MSNs-PEI et MSNs-PEG. Les concentrations finales sont les suivantes : 0 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 et 200 $\mu\text{g/mL}$. Il est à préciser que la masse correspond à la masse totale de l'échantillon (SiO₂ + greffon organique).

3.3.2 Test de cytotoxicité, coloration au crystal violet et expression des résultats

Les mêmes conditions opératoires que celles utilisées dans le chapitre 2 ont été appliquées. Elles sont résumées sur la Figure 3.32.

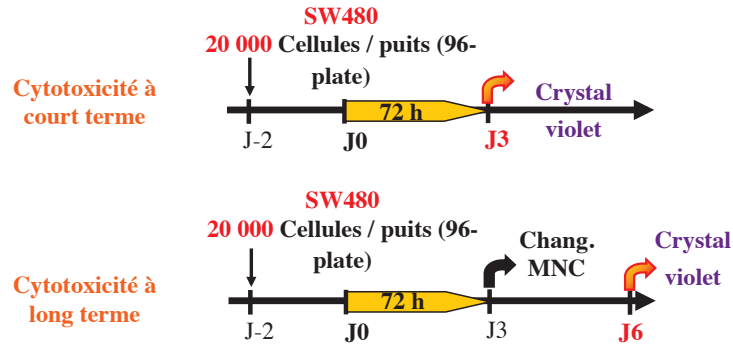


FIGURE 3.32 : Conditions opératoires utilisées lors des tests de cytotoxicité avec les MSNs fonctionnalisées.

De la même façon que pour le chapitre 2, les résultats sont présentés sous forme de viabilité cellulaire, calculée à partir des densités optiques $(DO)_{\text{puits}}$ et $(DO)_{\text{témoin}}$:

$$\% \text{ Viabilité cellulaire} = \frac{(DO)_{\text{puits}}}{(DO)_{\text{témoin}}} \times 100 \quad (3.9)$$

3.3.3 Résultats et discussion

Les viabilités cellulaires des cellules SW480 en fonction de la concentration, pour les deux conditions de temps et pour toutes les MSNs fonctionnalisées sont représentées sur la Figure 3.33.

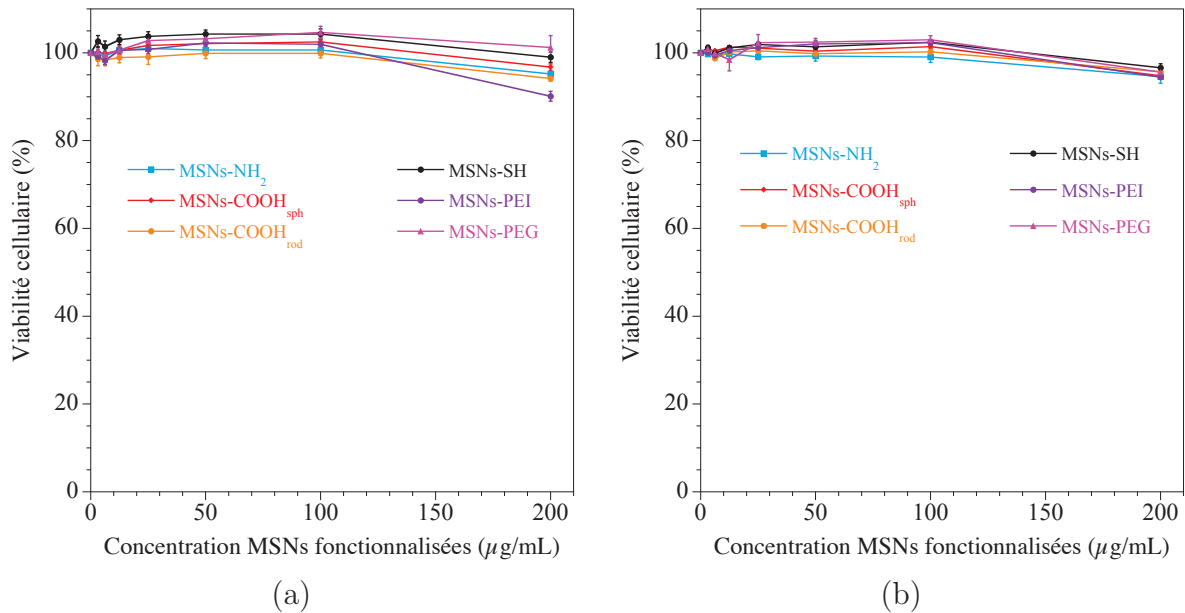


FIGURE 3.33 : Cytotoxicité des MSNs fonctionnalisées évaluées sur des cellules cancéreuses de côlon humain SW480. La révélation est effectuée directement après 72 heures de traitement (a) ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires (b).

La majorité des nanoparticules fonctionnalisées n'induit pas de cytotoxicité, et ce, quels que soient le temps de traitement et les concentrations utilisées. Les viabilités cellulaires sont toutes proches de 100%. Prolonger la culture cellulaire de 3 jours, n'a pas d'influence sur la viabilité

cellulaire, ce qui démontre que les MSNs n'induisent pas de mortalité retardée. Néanmoins, une légère cytotoxicité d'environ 5% apparaît pour quelques échantillons après 72 heures de temps de traitement et 3 jours de post-incubation supplémentaires mais celle-ci n'est pas significative.

3.4 Etude de l'internalisation des MSNs dans des cellules en culture

Dans la partie précédente, il a été démontré que les nanoparticules fonctionnalisées n'étaient pas cytotoxiques. Ainsi, deux possibilités peuvent être envisagées : soit les MSNs n'altèrent pas les cellules, soit les MSNs ne sont pas internalisées par les cellules et n'induisent donc pas de toxicité.

Afin d'étudier l'internalisation des MSNs par microscopie confocale, les nanoparticules ont tout d'abord été marquées par un fluorophore, la Rhodamine B isothiocyanate (RBITC) (Figure 3.35). Puis, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur ces particules afin de tester leur innocuité vis-à-vis des cellules tumorales.

3.4.1 Greffage de rhodamine B silanisée (RBITC-APTES) par co-condensation

Le greffage de la rhodamine isothiocyanate (RBITC) sur les nanoparticules a été réalisé en deux étapes. La première étape consiste à modifier la rhodamine B afin d'y incorporer un groupement triéthoxysilane qui va pouvoir dans la deuxième étape s'hydrolyser puis se co-condenser avec le TEOS.

3.4.1.1 Réactifs utilisés

Les synthèses décrites ci-dessous ont nécessité en plus des produits chimiques déjà présentés précédemment : de la rhodamine B isothiocyanate (RBITC, $M_W = 536 \text{ g.mol}^{-1}$, SIGMA-ALDRICH, CAS 81-88-9, 97%), du tétrahydrofurane $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ (THF, $M_W = 72,11 \text{ g.mol}^{-1}$, FISHER CHEMICALS, CAS 109-99-9, 99%) et du sulfoxyde de diméthyle $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ (DMSO, $M_W = 78,13 \text{ g.mol}^{-1}$, FISHER CHEMICALS, CAS 67-68-5, 99%).

3.4.1.2 Synthèse de RBITC-APTES

La première étape consiste à faire réagir la RBITC avec l'APTES et ainsi former une liaison de type thiocarbamide (NH-CS-NH) [478–480]. Dans une procédure typique [478–480], l'APTES (0,373 mol) est mélangé à la RBITC (0,365 mol) dans du THF anhydre³ et sous atmosphère inerte (N_2) afin d'éviter l'hydrolyse de l'APTES mais aussi parce que le groupement isothiocyanate (NCS^-) de la RBITC est sensible à l'eau. Après 24 heures sous agitation, à

3. Le THF est distillé en présence de sodium et de benzophénone (indicateur coloré).

température ambiante et dans l'obscurité, le THF est éliminé à l'évaporateur rotatif et environ 140 mg de RBITC-APTES ($M = 757,5$ g/mol) sont récupérés. La rhodamine ainsi modifiée est ensuite mise en solution dans le DMSO à une concentration de 10 mg/mL dans des récipients opaques pour éviter l'altération du fluorophore par photoblanchiment et est stockée à -18°C . Le schéma réactionnel de ce couplage est donné sur la Figure 3.34.

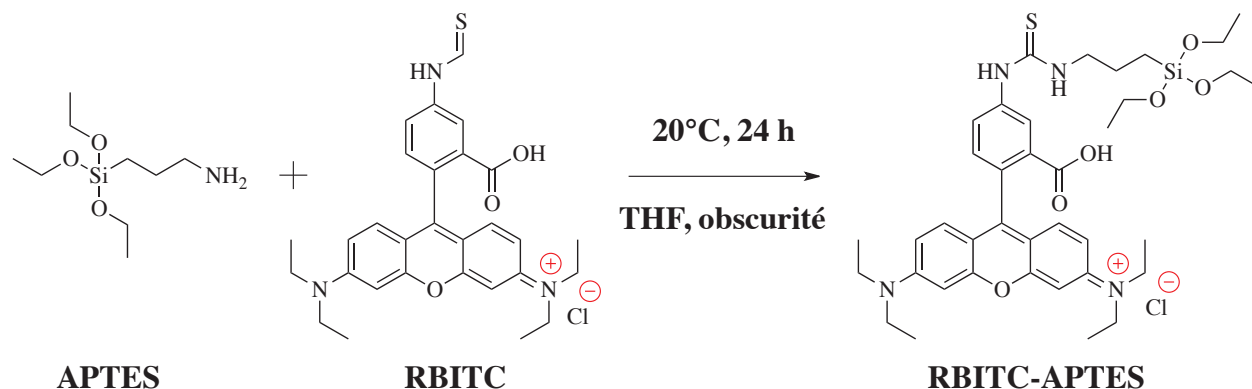


FIGURE 3.34 : Schéma réactionnel du couplage de l'APTES sur la rhodamine B isothiocyanate donnant de la RBITC-APTES

3.4.1.3 Conditions de greffage de la RBITC-APTES sur les MSNs

La synthèse des nanoparticules est effectuée en utilisant les mêmes conditions expérimentales que celles déjà décrites dans la section 3.1.1.2 et en utilisant comme silane secondaire la RBITC-APTES. La seule exception est que la solution de RBITC-APTES (10 mg/mL, DMSO, 682 μL) est ajoutée goutte à goutte après 10 secondes par rapport à la fin de l'ajout du TEOS [278]. Cette étape est cruciale car nous avons observé que des particules en forme de bâtonnets se formaient si les précurseurs siliciques étaient ajoutés en une seule fois. La quantité de RBITC-APTES ajoutée correspond à un pourcentage de 0,1% molaire par rapport à la quantité de silane total. Le système réactionnel est aussi protégé de la lumière pendant toute la durée de la synthèse afin d'éviter le phénomène de photoblanchiment. Les procédures de lavages et d'extraction sont les mêmes que celles déjà décrites précédemment (voir paragraphe 3.1.1.2). Les particules ainsi synthétisées sont nommées **MSNs-Rh**.

3.4.1.4 Caractérisations des MSNs fonctionnalisées par la RBITC-APTES

Après synthèse, la suspension colloïdale obtenue est stable. Le diamètre hydrodynamique des MSNs est de 160 nm avec un indice de polydispersité de 0,08. Les clichés MET révèlent des particules très bien dispersées après synthèse (résultats non montrés) et le comptage réalisé sur environ 100 particules donne une taille de 150 nm avec un coefficient de variation de 0,25. Dans ces conditions de synthèse, la présence de la rhodamine n'affecte donc pas les propriétés morphologiques des particules après synthèse.

3.4. Etude de l'internalisation des MSNs dans des cellules en culture

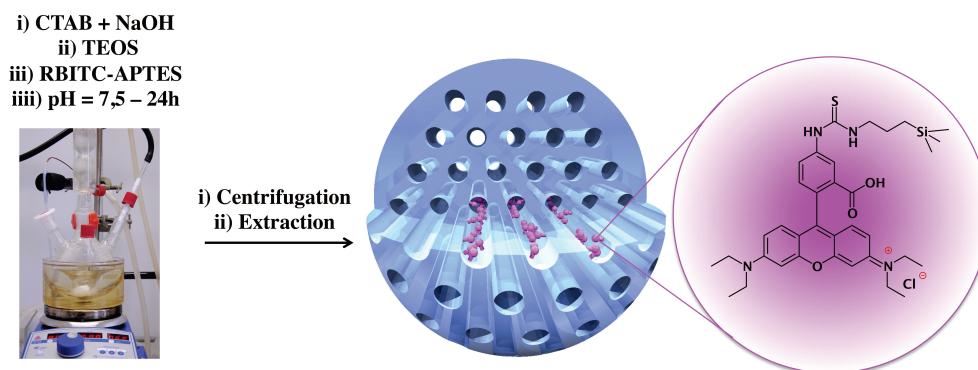


FIGURE 3.35 : Schéma récapitulatif du greffage de la rhodamine RBITC-APTES par co-condensation avec le TEOS. Dans l'éthanol, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la RBITC-APTES sont égales à 542 nm et 575 nm, respectivement.

Après extraction, les nanoparticules ont été caractérisées par UV-visible. Sur la Figure 3.36(a), le spectre de la RBITC-APTES montre un maximum d'absorbance à 549 nm. Ce maximum est retrouvé sur le spectre des particules modifiées par la rhodamine tandis qu'il n'est pas retrouvé sur les particules seules. Cela démontre que la rhodamine a été incorporée aux nanoparticules.

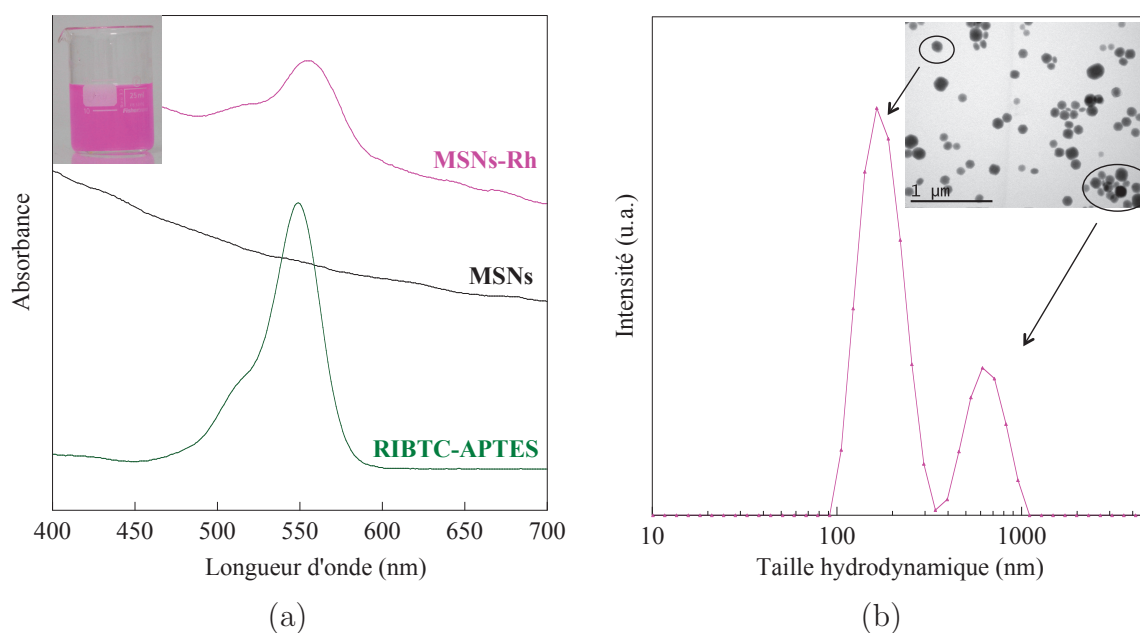


FIGURE 3.36 : Spectre UV-Visible de la RBITC-APTES, des particules seules et des particules modifiées par la rhodamine (a). Les spectres UV-Visibles ont été réalisés dans l'éthanol. Distribution de taille DDL en intensité et cliché MET des particules modifiées par la rhodamine après extraction (b). Sel de fond : NaCl 10^{-3} M.

Après extraction, les particules ont été caractérisées par DRX et par sorption de N_2 . L'allure de l'isotherme (non montrée) correspond à celle trouvée pour les matériaux de type MCM-41 avec une marche correspondant à la condensation capillaire caractéristique de la mésoporosité aux environs des pressions relatives $P/P_0 = 0,35$. La surface spécifique, le volume poreux et la taille des pores sont respectivement égales à $1071 \text{ m}^2/\text{g}$, $0,98 \text{ cm}^3/\text{g}$ et 2,8 nm. Le diffractogramme (non présenté) montre aussi les pics de réflexion caractéristiques de l'arrangement hexagonal 2D. La distance centre à centre a_0 obtenue est égale à 4,74 nm. La mesure du potentiel zêta

en fonction du pH (non présentée) montre que la présence de la rhodamine n'a pas d'influence sur les propriétés de surface des MSNs puisque l'allure obtenue est très proche des MSNs non fonctionnalisées.

En revanche, la microscopie (Figure 3.36(b)) montre des particules bien dispersées dont la taille moyenne MET est égale à 163 nm ($c_v = 0,29$) mais aussi des agrégats d'environ 700 nm. Les mesures de taille réalisées en diffusion de la lumière corroborent ces résultats puisque deux distributions de taille sont observées, une centrée à 160 nm et une autre à 600 nm.

3.4.2 Etude *in vitro* de la cytotoxicité des particules MSNs-Rh

Afin de vérifier l'innocuité des MSNs-Rh vis-à-vis des cellules tumorales, des tests de cytotoxicité ont été réalisés. La préparation de l'échantillon et les conditions opératoires sont strictement les mêmes que celles présentées pour les MSNs fonctionnalisées (voir paragraphe 3.3.2). Les viabilités cellulaires des cellules SW480 en fonction de la concentration en MSNs-Rh pour les deux conditions de temps sont données sur la Figure 3.37.

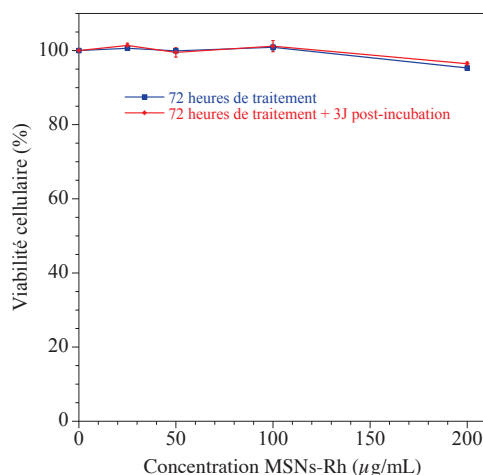


FIGURE 3.37 : Cytotoxicité des MSNs-Rh évaluée sur des cellules cancéreuses de côlon humain SW480. La révélation est effectuée directement après 72 heures de traitement ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires.

Les particules MSNs-Rh n'induisent aucun effet cytotoxique, et ce, quels que soient le temps de traitement et les concentrations utilisées. Les viabilités cellulaires sont toutes proches de 100%. Ces nanoparticules peuvent donc être utilisées afin d'étudier l'internalisation des MSNs dans les cellules.

3.4.3 Etude de l'internalisation des particules MSNs-Rh par microscopie confocale

Un suivi de l'internalisation des nanoparticules en fonction du temps de traitement a été réalisé par microscopie confocale. Ces expériences ont été menées en collaboration avec M. Michel Moussus du Laboratoire des Technologies de la Microélectronique (LTM) du CEA de Grenoble.

3.4.3.1 Protocole expérimental et présentation des résultats

Les tests d'internalisation sont réalisés sur la même lignée de cellules cancéreuses de côlon humain SW480 et dans les mêmes conditions de culture que celles utilisées pour les tests de cytotoxicité.

Les cellules sont implantées dans des plaques 4 puits au fond desquels des lames de verre y sont déposées. Le taux d'implantation est de 80 000 cellules/puits, ce qui correspond à un état de semi-confluence. Deux jours après l'implantation, les cellules sont traitées par les particules MSNs-Rh à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ (dispersées dans du NaCl à 10^{-3} M) et pour différents temps de traitement : 30 min, 2h, 4h, 8h, 20h et 32h. A la fin de chaque temps d'incubation, les cellules sont lavées plusieurs fois avec du PBS contenant les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} ($\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$) puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4% (m/v). Ensuite, les cellules sont abondamment lavées avec du ($\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$) et conservées à 4 °C jusqu'à l'analyse finale.

Au moment de l'analyse, certains organites de la cellule sont marqués par des fluorophores. Les cellules sont tout d'abord permabilisées avec du Triton X-100 (0,25% dans PBS) pendant 15 minutes, puis elles sont incubées avec une solution de Phalloïdine à 10 $\mu\text{g/mL}$ (PBS, 5% BSA, 0,1% Triton X-100) pendant 20 minutes, qui permet de visualiser les filaments d'actine. Les cellules sont par la suite lavées trois fois avec une solution de Triton X-100 (0,1% dans PBS). Ensuite, les cellules sont incubées pendant 5 minutes en présence d'une solution de Hoechst à 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (préparées dans du PBS), qui permet de visualiser les noyaux cellulaires. Les lames de verre sont égoutées et placées sans rinçage préalable sur une autre lame de verre et sont observées avec un microscope confocal TCS-SP2 (Leica) équipé d'un objectif $\times 63/1.4$ [481, 482].

Les résultats sont présentés pour trois plans focaux différents (Figure 3.38) : z_1 , plan focal entre le noyau et la lame de verre sur laquelle les cellules sont implantées, z_2 , plan focal au niveau du noyau, z_3 , plan focal entre le noyau et la lame de verre du microscope. Le marquage des filaments d'actine n'étant pas concluant, ils ne seront pas présentés.

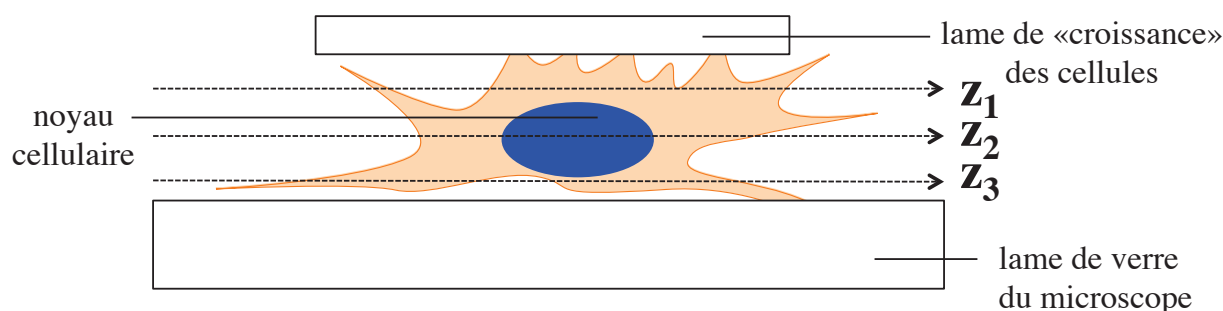


FIGURE 3.38 : Représentation schématique du montage utilisé pour les observations en microscopie confocale et des considérations faites pour l'interprétation des résultats.

3.4.3.2 Résultats et discussion

Les résultats de la microscopie confocale pour les différents temps de traitement étudiés et pour les plans focaux z_1 , z_2 et z_3 sont indiqués sur la Figure 3.39.

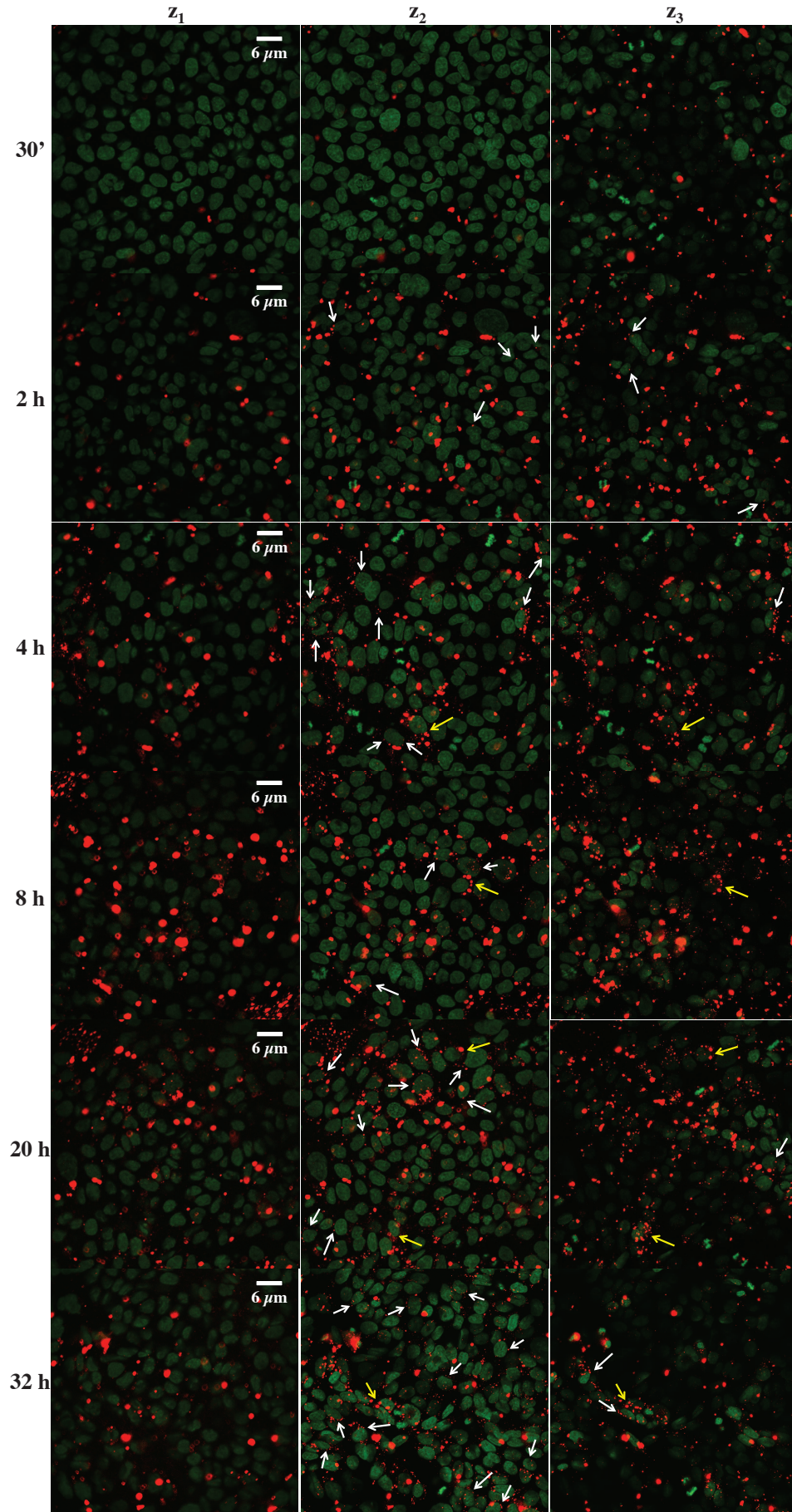


FIGURE 3.39 : Visualisation en microscopie confocale de la localisation des MSNs-Rh au sein des cellules cancéreuses coliques SW480 après différents temps de traitement : 30', 2h, 4h, 8h, 20h et 32h à la concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$. Les MSNs sont colorées en rouge et les noyaux en vert.

De façon générale, les MSNs se présentent soit sous la forme d'agrégats (marqués par des flèches jaunes), soit sous la forme de particules individualisées (marquées par des flèches blanches). Pour interpréter les résultats, seule l'observation des MSNs individualisées permet d'envisager l'internalisation des MSNs. La présence des agrégats ne renseigne pas sur l'internalisation car leur intensité de fluorescence est trop importante, et de ce fait, les agrégats semblent apparaître sur tous les plans focaux.

Au plan focal z_1 , c'est-à-dire à proximité de la lame de verre de croissance des cellules, le nombre de MSNs augmente avec le temps de traitement. A 30 minutes, les MSNs ne sont pas présentes en z_1 tandis qu'elles apparaissent pour les temps de 2 heures et atteignent un taux maximum à partir de 4 heures.

Au plan focal z_2 , aucune nanoparticule n'est présente après 30 minutes de traitement. A partir de 2 heures de traitement, les MSNs individualisées sont visibles au niveau du noyau des cellules. Leur nombre augmente à 4 heures puis semble rester stable pour de plus longues durées de traitement.

Au plan focal z_3 , c'est-à-dire à proximité de la surface de la cellule, le nombre de MSNs est important, et ce, dès 30 minutes. A partir de 32 heures, leur nombre diminue. Etant donné qu'aucune nanoparticule n'est présente à proximité des noyaux et qu'elles sont présentes à la surface des cellules pour 30 minutes de temps de traitement, les nanoparticules doivent probablement se fixer sur la membrane cellulaire avant d'être invaginées [483–485].

Il en ressort de ces résultats qu'un temps de traitement égale à 30 minutes est trop court pour suggérer une éventuelle internalisation des MSNs individualisées. Cette internalisation se produirait à partir de 2 heures de traitement (présence de MSNs individualisées dans le même plan focal que les noyaux) et serait optimale pour un temps de traitement de 4 heures. Ce résultat est en adéquation avec les travaux de Fisichella *et al.* [485] qui montrent que la quantité de MSNs internalisées atteint un niveau de saturation après 180 minutes d'incubation.

3.5 Conclusion

Plusieurs organosilanes ont été utilisés pour modifier la chimie de surface des MSNs. La fonctionnalisation par co-condensation et greffage post-synthèse ont été les deux voies étudiées dans ce chapitre. Dans le cadre de la fonctionnalisation par co-condensation, notre étude montre que la morphologie des nanoparticules fonctionnalisées dépend de l'organosilane utilisé et peut être de type sphérique ou asymétrique.

Les caractérisations structurales et texturales ont montré que ces nanomatériaux fonctionnalisés étaient de type MCM-41 et possédaient une surface spécifique élevée ($> 800 \text{ m}^2/\text{g}$) et un volume poreux important ($> 0,7 \text{ cm}^3/\text{g}$). Les caractérisations par zétamétrie, spectroscopie Raman, infrarouge et RMN ^{29}Si ont permis de mettre en évidence la présence des groupements fonctionnels introduits au sein du matériau. Les spectroscopies RMN ^{29}Si et infrarouge ont montré que la teneur en silanols diminuait notablement lorsque les nanoparticules étaient fonc-

tionnalisées. L'efficacité et le taux de greffage obtenus par analyse élémentaire corroborent ceux obtenus par analyse thermogravimétrique. En fonction de l'organosilane utilisé, l'efficacité de greffage varie entre 40 et 90%, et le taux de fonctionnalisation entre 0,3 et 1,4 mmol/g.

Afin d'améliorer la stabilité colloïdale des MSNs en milieu physiologique, le greffage de polymères en surface des MSNs a été étudié. Dans un premier temps, un organosilane comportant deux acides carboxyliques a été greffé à la surface externe des MSNs lavées mais non extraites. Les caractérisations par zétamétrie, spectroscopie RMN ^{29}Si et infrarouge ont montré que le greffage était bien effectif et qu'il avait lieu sur les deux types de silanols de surface (Q^3 et Q^4). Après extraction du tensioactif, la surface spécifique et le volume poreux de ces nanomatériaux restent très élevés et valent respectivement $904 \text{ m}^2/\text{g}$ et $0,75 \text{ cm}^3/\text{g}$. Les analyses élémentaires et thermogravimétriques ont donné des résultats concordants, à savoir un taux de greffage d'environ 0,6 mmol/g. Ce taux de greffage étant relativement élevé, une partie de la fonctionnalisation a probablement eu lieu à l'intérieur des canaux des MSNs. Dans un second temps, le mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ et la PEI₁₈₀₀ ont été greffés aux acides carboxyliques par couplage peptidique. Les caractérisations par zétamétrie et spectroscopie infrarouge ont permis de mettre en évidence le couplage peptidique, et par conséquent le greffage des polymères en surface des MSNs. Les analyses élémentaires et thermogravimétriques ont montré des taux de greffage égaux à 0,10 PEG/nm² et 0,50 PEI/nm². La présence des polymères en surface des particules a été aussi confirmée par une diminution de la surface spécifique et du volume poreux. Malgré l'efficacité du greffage, les nanoparticules ne sont pas stables dans une solution aqueuse dont la force ionique est comparable à celle du milieu physiologique.

Une étude *in vitro* de la cytotoxicité des nanoparticules fonctionnalisées a été menée en présence de cellules cancéreuses de type SW480. Les MSNs n'induisent pas de cytotoxicité, et ce, quel que soient le temps de traitement et la concentration utilisée (jusqu'à $200 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Afin de vérifier l'internalisation des nanoparticules dans les cellules cancéreuses, une étude par microscopie confocale a été réalisée. Les MSNs ont été fonctionnalisées au préalable par de la rhodamine silanisée. Cette étude révèle qu'un temps de traitement de 30 minutes est trop court pour permettre l'internalisation des nanoparticules. Celle-ci semble se produire à partir de 2 heures de traitement et est maximale pour un temps de traitement de 4 heures.

Chapitre 4

Encapsulation du cisplatine et comportement en présence de cellules en culture

Dans le but de montrer que les interactions physico-chimiques entre le nanovecteur et l'anticancéreux ont un impact sur la cinétique de libération du cisplatine mais également sur son taux d'encapsulation, l'adsorption et l'encapsulation du CDDP¹ dans les MSNs fonctionnalisées sont étudiées dans ce chapitre. Les quantités adsorbées sont caractérisées sur le solide par Spectrométrie d'Emission Atomique à Source Plasma (ICP-AES), ou directement dans la solution par spectroscopie d'absorption UV-Visible. Après optimisation de l'encapsulation par imprégnation, les quantités totales de platine encapsulé sont déterminées par ICP-AES et la localisation du CDDP est évaluée par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et en Transmission (MET). L'effet de la présence des groupements fonctionnels présents en surface des nanoparticules sur l'environnement local du platine est également caractérisé par spectroscopie Raman. Après encapsulation du cisplatine dans les nanoparticules de silice, la libération de l'anticancéreux est étudiée en milieu de culture à 37°C. Pour finir, la cytotoxicité des MSNs encapsulées est évaluée sur la lignée de cellules coliques SW480.

4.1 Détermination spectrophotométrique de la concentration du CDDP en solution aqueuse

4.1.1 Dosage spectrophotométrique du CDDP en solution aqueuse

De nombreuses méthodes permettent de déterminer la concentration et/ou l'environnement local du platine, que ce soit en milieu biologique (organes, urines ou tissus) ou dans des matrices

1. Dans ce chapitre, la dénomination CDDP est utilisée pour désigner le cisplatine « natif » ou modifié (hydrolysé, complexé...).

4.1. Détermination spectrophotométrique de la concentration du CDDP en solution aqueuse

organiques/minérales [312, 486]. Couplées à des méthodes de détection spectrométriques (ICP-AES, ICP-MS, ESI-MS) ou électrochimiques, ces techniques sont principalement spectroscopiques (Raman, UV-visible, XPS, AAS) ou impliquent la Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) [486]. Elles sont généralement divisées en deux catégories : les techniques non-sélectives, qui détectent seulement la quantité totale de platine, et les techniques sélectives, qui détectent les quantités du composé sous sa forme native ou modifiée. Par exemple, Hann *et al.* ont déterminé les concentrations des formes natives, mono- et diaqua du cisplatine dans les urines des patients en utilisant la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie à torche plasma (ICP-MS). Ils obtiennent des limites de détection respectivement égales à 0,74, 0,69 et 0,65 $\mu\text{g/L}$ pour les formes natives, mono- et diaqua du cisplatine [487]. Toutes ces méthodes restent néanmoins très spécifiques et complexes à mettre en œuvre.

Afin de déterminer la quantité de CDDP adsorbée au sein des différentes MSNs, nous avons choisi de suivre l'évolution de la concentration en CDDP en solution en présence des différentes MSNs par spectroscopie d'absorption UV-visible. En effet, si les affinités chimiques entre le CDDP et les MSNs sont modulées, les quantités adsorbées doivent être différentes. Ainsi, par différence entre les concentrations des solutions de CDDP avant et après adsorption, il est possible de quantifier les taux d'adsorption pour chaque type de particule. Sur la Figure 4.1, le spectre UV-visible du CDDP à différentes concentrations dans l'eau est présenté.

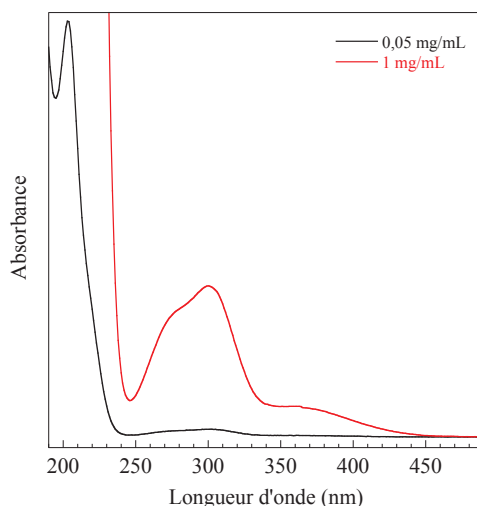


FIGURE 4.1 : Spectre d'absorption UV-visible du CDDP à différentes concentrations dans l'eau : (a) 1 mg/mL ; (b) 0,05 mg/mL. Toutes les solutions ont été conservées à l'abri de la lumière.

Dans un premier temps, le cisplatine en solution est caractérisé à une concentration correspondant à sa limite de solubilité dans du NaCl à 0,15 M (sérum physiologique), c'est-à-dire à 1 mg/mL. Le spectre présente deux pics d'absorbance à 285 nm et 301 nm dont les coefficients d'extinctions molaires ϵ_M valent 19 et 13 m^2/mol , respectivement. La bande à 301 nm est due à la transition électronique d-d de l'ion Pt^{2+} dans une géométrie plan carré (le cisplatine appartient au groupe ponctuel de symétrie C_{2v}) [488]. Un épaulement à 362 nm ($\epsilon_M = 2,42 \text{ m}^2/\text{mol}$) est également observable ainsi qu'un minimum d'absorbance à la longueur d'onde de 246 nm. A

4. Encapsulation du cisplatine et comportement en présence de cellules en culture

cette concentration, la bande d'absorption observée à une longueur d'onde de 203 nm (bande de transfert de charge [488]), dont le coefficient d'extinction molaire ϵ_M vaut 520 m²/mol, est saturée et il faut diluer la solution par 20 pour l'observer (soit une concentration finale de 0,05 mg/mL).

Comme nous l'avons déjà indiqué dans le chapitre 1 (voir paragraphe 1.5.3.2), le cisplatine subit en milieu aqueux des transformations par des réactions d'hydrolyse successives et des réactions acido-basiques [312, 313] (Figure 4.2) :

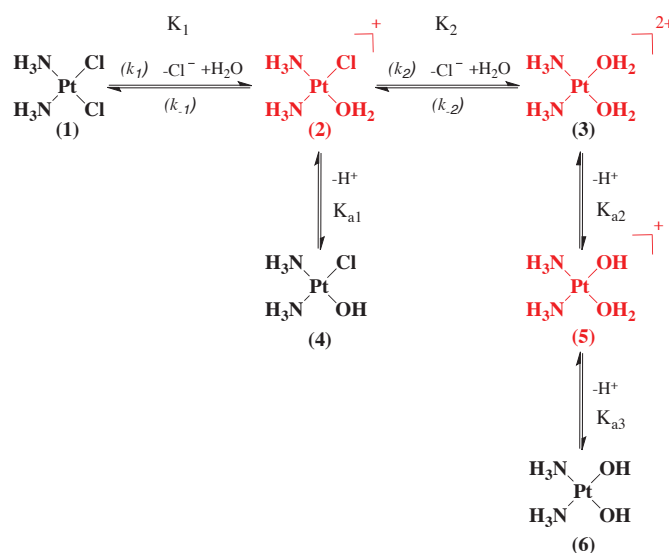


FIGURE 4.2 : Réactions successives d'hydrolyse et de déprotonation du CDDP en milieu aqueux ($pK_{a1} = 6,41$; $pK_{a2} = 5,37$; $pK_{a3} = 7,21$) [313]. Les espèces chargées positivement (très réactives) sont indiquées en rouge.

En solution aqueuse, il se produit une hydrolyse menant successivement aux complexes mono- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ et diaqua $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, beaucoup plus réactifs et sensibles vis-à-vis des nucléophiles. Ces composés sont aussi des acides faibles qui vont pouvoir se dissocier en solution aqueuse *via* des équilibres acido-basiques. Les valeurs des pK_a des espèces mono et diaqua ont été déterminées en suivant l'évolution des déplacements chimiques par RMN ^1H et RMN ^{15}N en fonction du pH à 27 °C [313]. Ces valeurs sont égales à $pK_{a1} = 6,41$, $pK_{a2} = 5,37$ et $pK_{a3} = 7,21$ [313]. La constante de vitesse pour la première hydrolyse est de l'ordre de 0,089 h⁻¹ dans l'eau à 27 °C [312]. Après 30 heures, 23% du cisplatine demeure intacte et 65% du cisplatine initial est sous la forme du produit de première hydrolyse (mono-aqua). Les produits de seconde hydrolyse (diaqua) n'apparaissent qu'après 3,5 heures mais leur taux ne dépasse jamais 7% [313]. Le produit de première hydrolyse est donc le composé le plus présent en solution. Au pH physiologique (pH = 7,4), c'est la forme $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH})]$ qui devrait prédominer.

Compte tenu de ces équilibres, nous avons suivi l'évolution des bandes d'absorption à 203 et 301 nm en fonction du temps. Ces deux bandes sont susceptibles d'être intéressantes pour la quantification, donc pour un étalonnage potentiel. L'évolution des spectres d'absorption UV-visible des solutions de CDDP à 1 mg/mL et 0,05 mg/mL dans l'eau est présentée sur la Figure 4.3.

4.1. Détermination spectrophotométrique de la concentration du CDDP en solution aqueuse

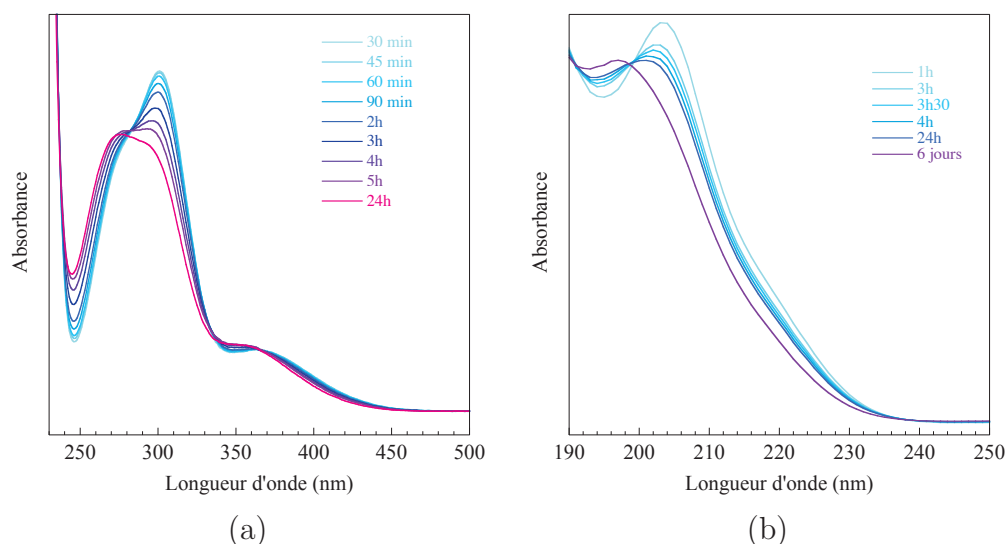


FIGURE 4.3 : Evolution du spectre d'absorption UV-visible du CDDP dans l'eau pour des concentrations de 1 mg/mL (a) et 0,05 mg/mL (b). Toutes les solutions ont été conservées à l'abri de la lumière.

Au cours du temps, l'absorbance maximale à 301 nm diminue significativement au profit de l'apparition d'un pic à environ 270 nm (Figure 4.3(a)). Dans ces conditions, il ne s'agit pas d'un point isobestique car les produits des réactions sont multiples. Comme le montre la Figure 4.3(b), l'intensité du pic à 203 nm diminue aussi très fortement avec le temps au profit de l'apparition d'un pic à environ 197 nm. Cette évolution se poursuit même au-delà de 6 jours, ce qui rend impossible l'étalonnage.

Pour éviter l'hydrolyse lors de son utilisation, le cisplatine est généralement dissous dans une solution de NaCl à 0,15 M (sérum physiologique). Afin de vérifier s'il est possible de renverser l'hydrolyse et de reformer le cisplatine sous sa forme native, une solution de cisplatine hydrolysée pendant 48 heures est re-diluée dans une solution de NaCl à 0,15 M. La Figure 4.4 montre qu'après 20 heures, le cisplatine est de nouveau présent sous sa forme native.

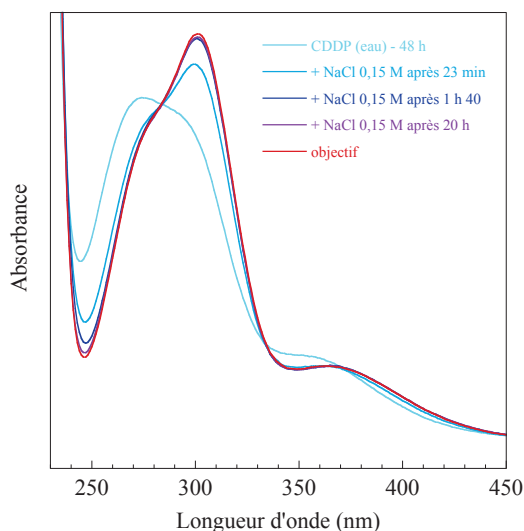


FIGURE 4.4 : Evolution du spectre d'absorption UV-visible d'une solution de CDDP à 1 mg/mL, hydrolysée 48 heures dans l'eau, puis rediluée dans une solution de NaCl à 0,15 M. Toutes les solutions ont été conservées à l'abri de la lumière.

Puisque l'hydrolyse du CDDP est une réaction réversible, un étalonnage devient tout à fait envisageable. Cependant, à une telle concentration en ions chlorures, nous observons que les solutions absorbent en dessous de 210 nm, ce qui ne permet pas de mesurer l'absorbance de la bande à 203 nm. De plus, de par son coefficient d'extinction faible, la bande d'absorbance à 301 nm ne permet pas une détection sensible de la concentration en solution de CDDP. Ainsi, une autre méthode de détermination spectrophotométrique impliquant la complexation du CDDP par un agent adapté a été envisagée.

4.1.2 Dosage spectrophotométrique de la concentration en CDDP en solution aqueuse par complexation avec l'OPDA

Compte tenu de l'instabilité du CDDP en solution aqueuse, des méthodes visant à stabiliser dans le temps les dérivés du CDDP par complexation ont été développées [486, 489–491]. Par exemple, un complexe stable peut être obtenu par association du CDDP ou de son produit d'hydrolyse et de l'*ortho*-phénylènediamine (OPDA) [490, 491]. Les groupements amine du l'OPDA chélatent le cisplatine en se substituant aux ligands aqua ou chloro selon la réaction suivante :

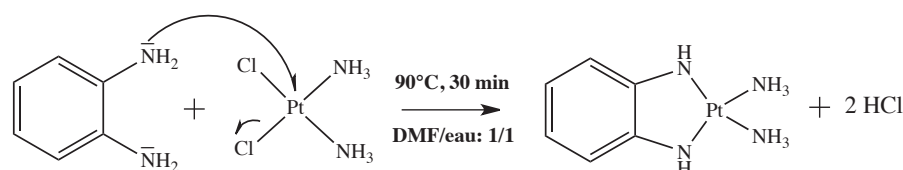


FIGURE 4.5 : Réaction de complexation entre l'*ortho*-phénylènediamine et le CDDP.

Cette méthode est particulièrement avantageuse puisque le complexe formé présente un pic d'absorbance caractéristique autour de 705 nm, c'est-à-dire dans une gamme de longueur d'onde pour laquelle ni l'OPDA, ni le CDDP et ni les MSNs n'absorbent (Figure 4.6).

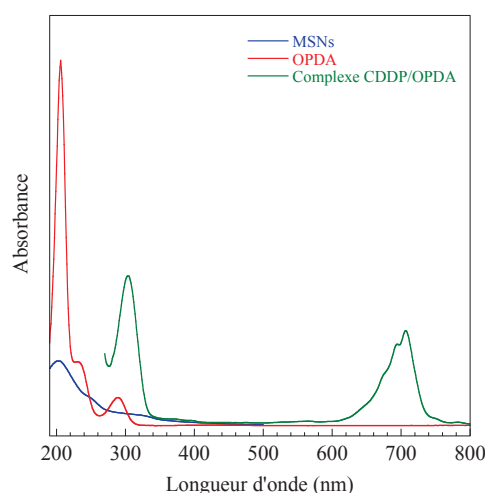


FIGURE 4.6 : Spectres UV-visible du mélange stœchiométrique CDDP/OPDA après réaction dans le DMF à 90 °C (courbe verte), de l'*ortho*-phénylènediamine dans l'eau (courbe rouge) et d'une suspension de MSNs dans l'eau après centrifugation (courbe bleue).

4.1. Détermination spectrophotométrique de la concentration du CDDP en solution aqueuse

De nombreux facteurs expérimentaux comme la température, la vitesse d'agitation, le pH du milieu réactionnel, l'exposition à la lumière, les rapports molaires CDDP/OPDA, le taux d'hydrolyse du CDDP ou encore la nature du solvant influencent fortement le rendement de la réaction ainsi que la valeur du maximum d'absorbance à 705 nm [490, 492].

4.1.2.1 Protocole expérimental

Dans le protocole que nous avons mis en place [492], 100 μL d'une solution aqueuse de CDDP sont ajoutés à 30 μL d'une solution de NaCl à 5 M. Puis, 870 μL d'eau ultrapure sont ajoutés au milieu réactionnel. Pour être sûr que le CDDP soit sous sa forme chlorée, cette solution est laissée à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 5 jours. Ensuite, 1 mL d'une solution d'OPDA à 2,15 mg/mL dans le DMF (60 équivalents molaires de CDDP à 1 mg/mL) est ajouté à cette solution et le mélange est placé dans un bain thermostaté à 90 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement, le milieu réactionnel est dilué avec un mélange DMF/eau : 7/3 (v/v) jusqu'à obtenir 10 mL de solution. Sans dilution préalable, la solution est analysée par spectroscopie UV-visible.

4.1.2.2 Droite d'étalonnage et validation de la méthode

Sur la Figure 4.7(a), les spectres UV-visible des mélanges CDDP/OPDA sont présentés pour des concentrations en complexe de 27,67 μM à 0,55 μM . La droite d'étalonnage est reportée sur la Figure 4.7(b).

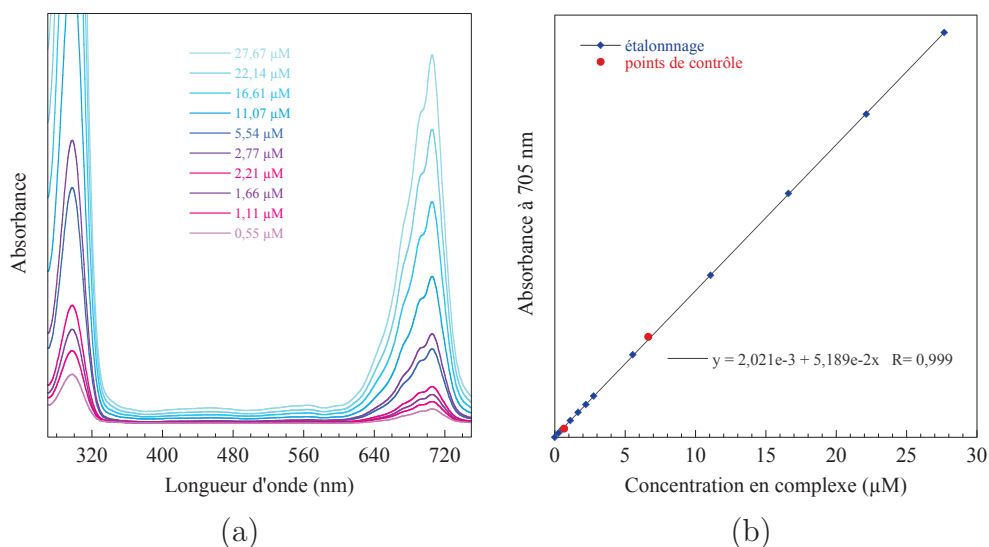


FIGURE 4.7 : (a) Spectres UV-visible des mélanges CDDP/OPDA pour des concentrations en complexe de 27,67 μM à 0,55 μM . (b) Droite d'étalonnage et points de contrôle de la validité de la méthode.

Afin de valider cet étalonnage, deux solutions diluées de CDDP dont les concentrations sont connues (0,2 mg/mL et 0,02 mg/mL) ont été préparées indépendamment. L'absorbance de ces solutions est ensuite mesurée à 705 nm, après réaction avec l'OPDA.

Après réaction avec l'OPDA, leurs absorbances sont mesurées. Comme le montre la Figure 4.7, elles sont en excellente adéquation avec la droite d'étalonnage, ce qui valide le protocole de complexation du CDDP à l'OPDA ainsi que l'étalonnage.

4.2 Etude de l'adsorption du CDDP sur les différents types de MSNs

Dans les chapitres précédents, différentes MSNs ont été synthétisées puis caractérisées par des techniques complémentaires. Ces particules possèdent des groupements chimiques qui doivent influencer les propriétés d'adsorption vis-à-vis du cisplatine. Pour mettre en évidence ces différences, l'adsorption du CDDP sur les différentes MSNs a été caractérisée soit par mesure de l'absorbance du complexe formé entre l'OPDA et le CDDP en solution, soit par mesure directe de la quantité de platine contenue dans les MSNs après adsorption.

Les différentes MSNs testées sont celles dont les synthèses et les caractéristiques physico-chimiques ont été présentées dans les deux chapitres précédents, à savoir : MSNs_{ext}, MSNs-PEG, MSNs-PEI, MSNs-NH₂, MSNs-COOH_{sph}, MSNs-COOH_{rod} et MSNs-SH.

4.2.1 Protocole expérimental de la mesure des quantités adsorbées de CDDP par spectrométrie d'absorption UV-visible

Les mesures des quantités de platine adsorbées à la surface des différentes MSNs se font par différence entre la concentration de platine d'une solution mère à 1 mg/mL et la concentration de platine contenus dans les surnageants des différentes suspensions des MSNs dispersées dans une solution de CDDP (100 mg de MSNs et 20 mL de CDDP à 1 mg/mL).

Pour cela, les MSNs sont redispersées aux ultrasons dans une solution de CDDP à 1 mg/mL, préalablement « vieillie » pendant 6 heures, ce qui permet d'avoir principalement le cisplatine sous la forme du produit de première hydrolyse ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$). Les suspensions obtenues sont ensuite agitées pendant 18 heures à l'abri de la lumière et centrifugées (24 630 g, 15 minutes). Les surnageants sont prélevés et la concentration en CDDP est déterminée après réaction avec l'OPDA, suivant le protocole décrit dans le paragraphe 4.1.2.1. Parallèlement, la solution mère de CDDP est traitée de la même façon. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique de platine par rapport à la masse totale d'échantillon.

4.2.2 Protocole expérimental de la mesure des quantités adsorbées de platine par ICP-AES

Pour chacun des échantillons précédents, les culots obtenus après centrifugation sont séchés sous vide à l'abri de la lumière puis analysés par ICP-AES (Annexe F). Afin de limiter la surestimation du taux d'adsorption, le maximum de surnageant possible est retiré des centrifugats

avant séchage. Les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage massique du platine par rapport à la masse totale d'échantillon.

4.2.3 Résultats et discussion

Pour les différentes MSNs fonctionnalisées, les taux de platine déterminés par UV-visible et ICP-AES sont présentés sur la Figure 4.8.

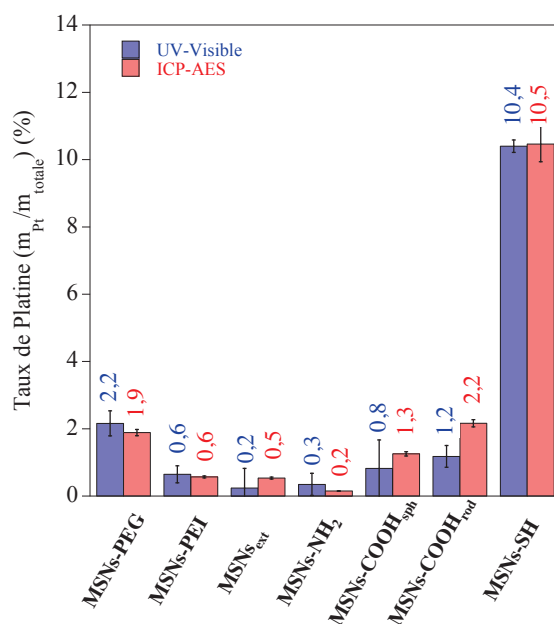


FIGURE 4.8 : Taux d'adsorption du platine sur les différents types de MSNs mesurés par spectrophotométrie UV-visible ou par mesure ICP-AES. Les barres d'erreurs représentent les erreurs absolues. Par spectrophotométrie, l'erreur est estimée à partir de trois mesures indépendantes de l'absorbance du pic à 705 nm. L'erreur sur les mesures ICP-AES est égale à 5%.

Les taux d'adsorption dépendent de la nature des groupements fonctionnels présents à la surface des MSNs. Les taux d'adsorption en platine par les MSNs modifiées sont supérieures à celui des MSNs non fonctionnalisées (MSNs_{ext}), à l'exception des MSNs comportant des fonctions amines (MSNs-NH₂).

Quelle que soit la méthode expérimentale utilisée pour quantifier le taux de platine adsorbé en surface des MSNs, les quantités adsorbées pour un type de nanoparticules sont proches. Par conséquent, nous utiliserons le taux de platine déterminé par ICP-AES afin de calculer pour toutes les MSNs fonctionnalisées, le taux d'utilisation des groupements fonctionnels présents en surface des nanoparticules.

Lorsque des groupements carboxyliques sont présents en surface des MSNs, les capacités d'adsorption sont sensiblement améliorées. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1 dans le cas de micelles polymériques (PEG-P(Glu))(paragraphe 1.5.5.2) ou encore de MSNs présentant des fonctions carboxyliques en surface (paragraphe 1.5.6), un complexe entre le CDDP et les acides carboxyliques de surface peut être formé (2 COOH/platine) [15, 334, 342, 493].

Considérons tout d'abord les particules MSNs-COOH_{rod}. Le taux de greffage calculé pré-

4. Encapsulation du cisplatine et comportement en présence de cellules en culture

cédemment (moyenne entre celui déterminé par ATG et par AE) est égal à 0,76 mmol COOH/ $g_{\text{MSNs-COOH}_{\text{rod}}}$. Si l'on considère qu'un atome de platine peut se complexer à deux acides carboxyliques (comme dans le cas du carboplatine, voir section 1.5.4), il est donc possible d'obtenir un taux de 0,38 mmol Pt/ $g_{\text{MSNs-COOH}_{\text{rod}}}$, soit 6,65% ($m_{\text{Pt}}/m_{\text{totale}}$). Pour cet échantillon, les conditions expérimentales sont telles que l'on travaille en excès de platine car le rapport molaire entre la quantité maximale de platine qui peut se complexer et la quantité ajoutée est égal à 1/1,8. Au regard du taux de platine obtenu par ICP-AES (2,2%), le taux d'utilisation des fonctions carboxyliques est de 52%.

Pour les particules MSNs-COOH_{sph}, le taux de greffage calculé précédemment est égal à 0,58 mmol COOH/ $g_{\text{MSNs-COOH}_{\text{sph}}}$, soit 0,29 mmol Pt/ $g_{\text{MSNs-COOH}_{\text{sph}}}$ ou 5,21% ($m_{\text{Pt}}/m_{\text{totale}}$). Pour cet échantillon, les conditions expérimentales sont telles que l'on travaille en large excès de platine avec un rapport molaire de 1/2,3. Au regard du taux de platine obtenu par ICP-AES (1,3%), le taux d'utilisation des fonctions carboxyliques est de 24%.

Pour les deux échantillons comportant des fonctions carboxyliques, environ la moitié des groupements se sont donc complexés, ce qui montre que soit certaines fonctions carboxyliques ne sont pas disponibles, soit la distance entre deux fonctions carboxyliques n'est pas suffisante pour chélater un seul atome de platine. Dans le cadre de cette dernière hypothèse, l'une des possibilités qui pourrait être envisagée afin d'améliorer le taux d'adsorption du platine serait d'augmenter le taux de greffage des fonctions carboxyliques.

Après l'hydrolyse du CDDP, le composé fortement électrophile formé peut réagir avec des espèces nucléophiles comme les amines [316]. Pour les particules MSNs-NH₂, le taux de greffage calculé précédemment est égal à 0,72 mmol/ $g_{\text{MSNs-NH}_2}$, soit 0,36 mmol Pt/ $g_{\text{MSNs-NH}_2}$ ou 6,3% ($m_{\text{Pt}}/m_{\text{totale}}$), si deux fonctions amines se complexent à un atome de platine. Le rapport molaire entre la quantité maximale de platine qui peut se complexer et la quantité ajoutée est égal dans ce cas à 1/1,9. Le taux de platine obtenu par ICP-AES pour cet échantillon est très faible et vaut 0,2%. Le taux d'utilisation des fonctions amines est donc égal à 3%. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 3 (voir paragraphe 3.1.3), les fonctions amines sont susceptibles de former avec les groupements silanols de surface une espèce zwitterionique de la forme $\equiv\text{SiO}^-, {}^+\text{H}_3\text{NC}_3\text{H}_6-\text{Si}\equiv$, ce qui rend probablement les fonctions amines indisponibles pour la complexation avec l'atome de platine. De plus, au pH correspondant aux conditions de travail, les fonctions amines sont protonées (voir paragraphe 3.1.3). Pour maximiser le taux de complexation du cisplatine, il conviendrait de réaliser l'adsorption dans des conditions où les amines sont sous leur forme déprotonée, c'est-à-dire en milieu basique, conditions dans lesquelles le cisplatine risque de précipiter ou de former un hydroxyde métallique Pt(OH)₂.

Pour les particules MSNs-PEI, le taux de greffage obtenu est de 0,1 mmol/ $g_{\text{MSNs-PEI}}$. En considérant 42 azotes/chaîne de PEI et 2 azotes/platine, il est possible de complexer 2,1 mmol Pt/ $g_{\text{MSNs-PEI}}$, soit 25,13% ($m_{\text{Pt}}/m_{\text{totale}}$). Pour cet échantillon, le rapport molaire entre la quantité maximale de platine qui peut se complexer et la quantité ajoutée est égal à 1/0,3. La quantité de platine ajoutée n'étant pas en excès, le taux de platine adsorbé ne pourra atteindre 25,13%. Le

4.3. Encapsulation du CDDP dans les MSNs

taux de platine après adsorption est égal à 0,6%, le taux d'utilisation des fonctions amines est faible et est égal à seulement 2%, probablement parce qu'au pH de travail les fonctions amines de la PEI sont protonées.

Le taux de greffage obtenu pour les MSNs-PEG vaut 0,02 mmol/g_{MSNs-PEG}. En considérant 227 oxygènes/chaîne de PEG et 2 oxygènes/platine, 2,3 mmol Pt/g_{MSNs-PEG} peuvent se complexer, soit 26,64% (m_{Pt}/m_{totale}). Le rapport molaire entre la quantité maximale de platine susceptible de se complexer et la quantité ajoutée est égal à 1/0,3. Le taux de platine après adsorption est égal à 1,9%, le taux d'utilisation des oxygènes du PEG est de 7%.

Pour les particules MSNs-SH, le taux de greffage obtenu précédemment vaut 1,3 mmol SH/g_{MSNs-SH}. En considérant 1 soufre/platine, il est possible de complexer 1,3 mmol Pt/g_{MSNs-SH}, soit 18,24% (m_{Pt}/m_{totale}). Dans les conditions expérimentales de l'étude, le rapport molaire entre la quantité maximale de platine susceptible de se complexer et la quantité ajoutée est égal à 1/0,5. Le taux de platine pour cet échantillon étant égal à 10,5%, le taux d'occupation des fonctions thiols est donc de 58%. Les MSNs fonctionnalisées par des groupements thiols montrent de très bonnes capacités d'adsorption car l'atome de soufre est capable de former une liaison covalente avec le platine(II), en accord avec la théorie HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*) [326, 494–496]. La formation de cette liaison covalente est d'ailleurs l'une des raisons qui limite fortement l'efficacité du CDDP en chimiothérapie. En effet, une fois passé à travers la membrane cellulaire, le CDDP est soumis à une détoxification par le glutathion. Ce tri-peptide formé par trois acides aminés (acide glutamique-cystéine-glycine (GSH)) possède une fonction SH qui se lie au CDDP par liaison covalente et empêche sa complexation avec l'ADN [497].

4.3 Encapsulation du CDDP dans les MSNs

Des études de cytotoxicité du CDDP que nous avons réalisées sur les cellules coliques SW480 ont montré que pour un temps de traitement de 72 heures, la concentration en CDDP à laquelle 50% des cellules étaient mortes (IC₅₀), était égale à $(10,6 \pm 0,9) \mu\text{M}$. En envisageant d'injecter une suspension de MSNs à 100 $\mu\text{g/mL}$, **il est donc nécessaire d'encapsuler au minimum 3% (m/m) de CDDP** pour que la quantité de CDDP délivrable corresponde à une dose équivalente à l'IC₅₀. Par adsorption, le taux d'encapsulation atteint difficilement ce seuil. Une méthode d'encapsulation par imprégnation a donc été mise en place.

4.3.1 Recherche d'un protocole d'encapsulation par imprégnation

Afin de trouver une méthode d'encapsulation plus efficace que l'adsorption, deux voies peuvent être envisagées : la voie sèche ou la voie humide. Le CDDP se dégrade à une température de 270 °C, ce qui exclut *a priori* toute technique mécanique d'encapsulation (broyage suivi d'un traitement thermique). L'encapsulation par voie liquide a donc été envisagée.

Différentes méthodes d'encapsulation du CDDP par imprégnation dans les MSNs sont

4. Encapsulation du cisplatine et comportement en présence de cellules en culture

proposées dans la littérature [140, 143]. De manière à maximiser les quantités encapsulées, et ainsi minimiser le rapport SiO_2/CDDP , la voie d'encapsulation du CDDP par imprégnation nécessite un solvant dans lequel le cisplatine est très soluble. Les solubilités du cisplatine pour différents solvants sont présentées dans le Tableau 4.1.

TABLEAU 4.1 : *Solubilités apparentes du cisplatine dans différents solvants à 25 °C [312], températures d'ébullition à pression normale (T° -ébullition) et pressions de vapeur saturante des solvants (P_{sat}).*

Solvant	Solubilité du CDDP (mg/mL)	T° -ébullition (°C)	P_{sat} (°C) (Pa)
DMF	20,01	153	133 (20 °C)
DMAC	18,00	165	380 (20 °C)
DMSO	349,84	189	59 (25 °C)
H ₂ O (24 heures/48 heures)	2,31/2,49	100	3200 (25 °C)
0,15 M NaCl	1,50	-	-

Le cisplatine n'est pas soluble dans les alcools ainsi que dans le plupart des solvants organiques à l'exception du N,N'-diméthylformamide (DMF), du N,N-diméthylacétamide (DMAC) et du diméthylsulfoxyde (DMSO) [312]. Le DMSO n'est pas inerte à l'égard du cisplatine. En effet, en raison du pouvoir ligand de l'atome de soufre, une solvolysse a lieu et un complexe très stable qui possède des propriétés cytotoxiques inférieures à celles du cisplatine est formé (Figure 4.9).

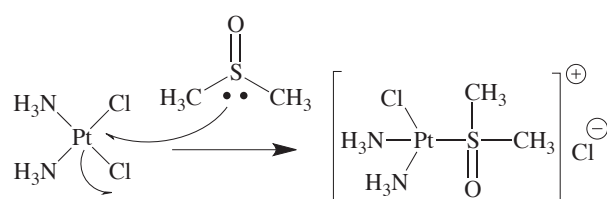


FIGURE 4.9 : *Mécanisme de formation du complexe formé entre le CDDP et le DMSO [498].*

Par ailleurs, la visée biomédicale des MSNs chargées en CDDP proscrit toute utilisation d'un solvant organique toxique où le cisplatine y est plus soluble comme le DMF et le DMAC. De plus, au regard des températures d'ébullition et des pressions de vapeur saturante de ces solvants (Tableau 4.1), leur élimination complète est difficile. Les méthodes d'encapsulation par imprégnation des MSNs en solution aqueuse semblent donc les plus indiquées.

Plusieurs méthodes d'encapsulation par imprégnation sont envisageables. La première méthode est celle de l'imprégnation à sec. Elle consiste à ajouter une solution saturée de CDDP (1 mg/mL) dont le volume est égal au volume poreux de la poudre à encapsuler (1 cm³/g). Cette méthode est très fastidieuse puisqu'elle nécessiterait 30 cycles d'ajout et de séchage pour un taux d'encapsulation de seulement 3% (m/m), valeur nécessaire pour que la quantité de CDDP délivrable corresponde à une dose équivalente à l'IC₅₀. De plus, réalisée pour 5 cycles d'ajout et de séchage, nous avons observé que cette méthode était très peu efficace. En effet, la microscopie électronique en transmission a révélé que la majorité du cisplatine se trouve à l'extérieur des canaux des particules (résultats non montrés).

4.3. Encapsulation du CDDP dans les MSNs

Une deuxième méthode est celle de l'imprégnation par séchage à l'évaporateur rotatif d'une suspension de MSNs contenant une solution de CDDP. En choisissant une pression réduite, une température adéquate et en travaillant à l'abri de la lumière (le cisplatine est sensible à la lumière), il est possible d'évaporer lentement la suspension et de favoriser la migration du cisplatine dans les canaux des MSNs en créant des sites de cristallisation préférentielle. Plusieurs tests ont été réalisés à des températures de 40 °C et 80 °C pour différentes pressions. Cependant, cette méthode s'avère très peu reproductible à cause d'un contrôle difficile de la vitesse d'évaporation. De plus, la majorité du cisplatine cristallise en dehors des MSNs.

Enfin, la dernière méthode consiste à placer la suspension (MSNs + cisplatine) à l'étuve et à l'abri de la lumière dans un bêcher ouvert. C'est l'évaporation à 40 °C de 20 mL de suspension de CDDP à 1 mg/mL en présence de 100 mg de MSNs extraites (MSNs_{ext}) dans un bêcher de 100 mL qui a donné les résultats les plus concluants. En effet, les images MET de la Figure 4.10 montrent que le CDDP cristallisé apparaît sous la forme de nanocristaux caractérisés par des taches sombres alignées suivant les canaux. En mode balayage et annulaire champ sombre à grand angle (STEM-HAADF) (*Scanning Transmission Electron Microscopy-High Angle Annular Dark Field*), le contraste étant proportionnel au numéro atomique *Z*, la présence des nanocristaux apparaît sous forme de taches blanches alignées suivant les canaux. Des clichés d'une même zone de l'échantillon pris sous différents angles en le faisant pivoter le long de l'axe (Y) avec des incréments réguliers de 20° montrent clairement que les cristaux de CDDP sont bien localisés dans les canaux des MSNs.

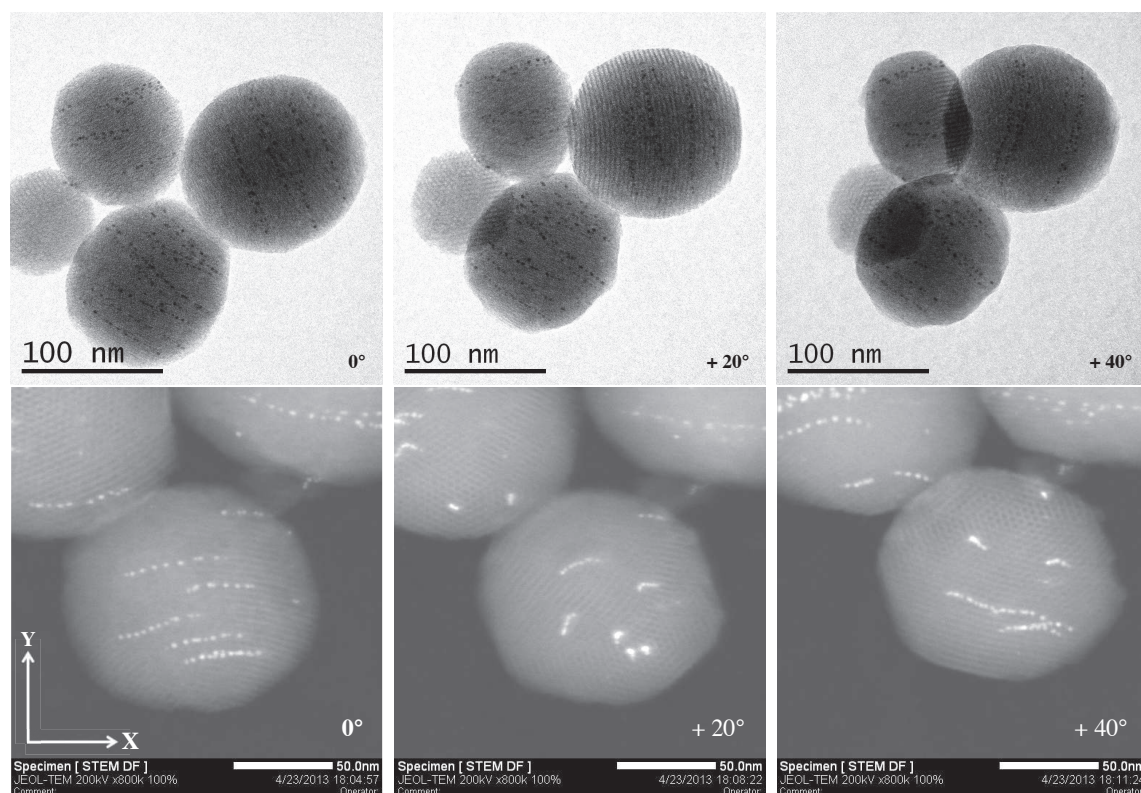


FIGURE 4.10 : Micrographies MET et STEM-HAADF des MSNs extraites, non fonctionnalisées et encapsulées par imprégnation avec le cisplatine après évaporation du solvant à 40 °C sous air et à l'abri de la lumière.

Le protocole d'encapsulation permettant de tels résultats a été adapté aux échantillons fonctionnalisés. Les MSNs (100 mg) sont dispersées à l'aide des ultrasons dans 20 mL d'une solution aqueuse de CDDP à 1 mg/mL, préalablement hydrolysée pendant 6 heures, ce qui correspond à un **taux d'encapsulation de 10,8% (m_{Pt}/m_{totale})**. Puis, cette suspension est placée sous agitation pendant 18 heures. La suspension est ensuite séchée à l'étude à 40 °C à l'abri de la lumière. Cette étape dure environ 24 heures.

Malgré ces conditions expérimentales optimisées, certains cristaux de CDDP sont présents en dehors des canaux des particules. Afin de les éliminer, les poudres sèches sont récupérées, broyées puis redispersées dans 15 mL d'éthanol à l'aide des ultrasons. Le cisplatine n'étant pas soluble dans l'éthanol, les cristaux de CDDP sédimentent tandis que les nanoparticules (contenant du CDDP) restent en suspension. Après 15 minutes de sédimentation, les suspensions sont récupérées puis centrifugées. Les culots obtenus sont séchés sous vide, puis broyés. Dans la suite du chapitre, tous les échantillons encapsulés avec du CDDP seront notés CDDP@X où X est le nom de l'échantillon avant encapsulation.

4.3.2 Détermination des taux encapsulés par ICP-AES

Pour tous les échantillons encapsulés, les taux de platine ont été déterminés par ICP-AES. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.11. Les taux de platine sont exprimés par rapport à la quantité totale d'échantillon.

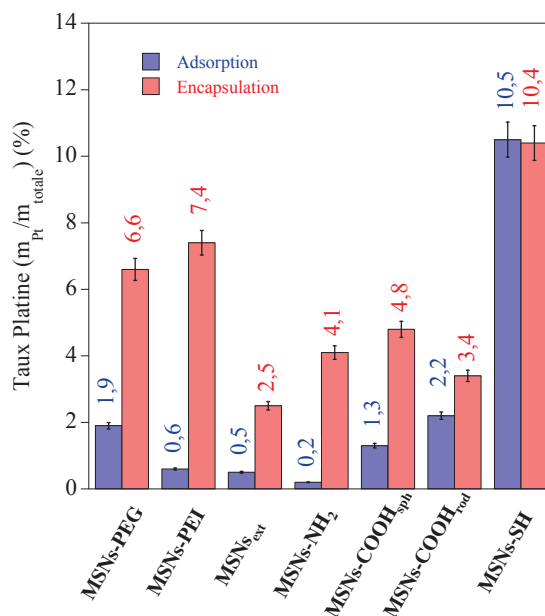


FIGURE 4.11 : Taux de platine déterminés par ICP-AES pour l'adsorption et l'imprégnation du CDDP dans les différentes MSNs. Les barres d'erreurs représentent les erreurs absolues.

L'encapsulation par imprégnation a permis dans tous les cas à l'exception des MSNs-SH, d'augmenter les quantités de platine présent au sein du matériau. Ces taux peuvent probablement être améliorés en optimisant les conditions d'encapsulation comme la surface d'exposition à l'air ou la température de l'évaporation.

Dans le but de connaître la répartition globale des « cristaux » de CDDP au sein des particules (extérieur ou intérieur des canaux), les poudres encapsulées ont été caractérisées par microscopie électronique à balayage (MEB).

4.3.3 Caractérisation des échantillons encapsulés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les analyses en microscopie électronique à balayage ont été réalisées en utilisant le mode électrons rétrodiffusés, où les contrastes dépendent des numéros atomiques des éléments présents sur l'échantillon. Les images MEB du cisplatine seul et des différents échantillons encapsulés puis lavés à l'éthanol sont présentées sur la Figure 4.12.

Le CDDP seul se présente sous la forme de cristaux dont les tailles varient entre 20 μm et 100 μm . L'analyse par spectrométrie à sélection d'énergie (*Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS) réalisée sur toute la zone de l'échantillon présentée donne un rapport atomique Pt/Cl égal à 0,44 et correspond bien à celui du cisplatine (Pt/Cl = 0,5). Pour tous les échantillons à l'exception du CDDP@MSNs-SH, les clichés montrent que des cristaux de cisplatine (régions plus claires) sont présents à l'extérieur des particules, et ce, malgré les lavages à l'éthanol. Ces cristaux doivent être fortement associés aux matériaux. Par rapport aux cristaux de CDDP seul, leur taille a diminué ; certains cristaux mesurent quelques micromètres, d'autres peuvent atteindre environ 30 μm . L'analyse EDS réalisée sur le pointé ❶ (Figure 4.12) montre qu'il s'agit du cisplatine mais partiellement hydrolysé puisque le rapport atomique Pt/Cl est égal à 0,45.

Dans le but d'estimer la proportion de platine présent à l'intérieur des pores et à l'extérieur des particules, nous avons utilisé l'approche semi-quantitative suivante : soit le rapport atomique Pt/Si est déterminé sur une zone d'environ 0,25 mm² (noté $(\frac{Pt}{Si})_{\text{global}}$), soit le rapport atomique Pt/Si est déterminé sur un amas de particules (pointé ❷ sur la Figure 4.12) en prenant bien soin d'éviter les cristaux visibles de CDDP ($(\frac{Pt}{Si})_{\text{local}}$). L'homogénéité de la distribution de CDDP au sein de l'échantillon, donc la distribution de platine dans le matériau, est définie par le rapport (noté $(\frac{Pt}{Si})_{\text{local}}/(\frac{Pt}{Si})_{\text{global}}$). Plus celui-ci est proche de l'unité, moins le platine est présent à l'extérieur des particules. Pour tous les échantillons, les résultats sont présentés dans le Tableau 4.2.

TABLEAU 4.2 : Caractérisation de l'homogénéité de la distribution du platine au sein des particules par la détermination des rapports atomiques Pt/Si de manière « globale » et de manière « locale ».

Particules	$\%(\frac{Pt}{Si})_{\text{local}}$	$\%(\frac{Pt}{Si})_{\text{global}}$	$\%(\frac{Pt}{Si})_{\text{local}}/\%(\frac{Pt}{Si})_{\text{global}}$
CDDP@MSNs _{ext}	2,32	7,15	0,32
CDDP@MSNs-PEG	2,83	4,80	0,59
CDDP@MSNs-SH	16,57	16,95	0,98
CDDP@MSNs-COOH _{rod}	1,34	3,38	0,39
CDDP@MSNs-NH ₂	2,05	5,08	0,40
CDDP@MSNs-COOH _{sph}	1,37	5,15	0,27
CDDP@MSNs-PEI	6,48	8,01	0,81

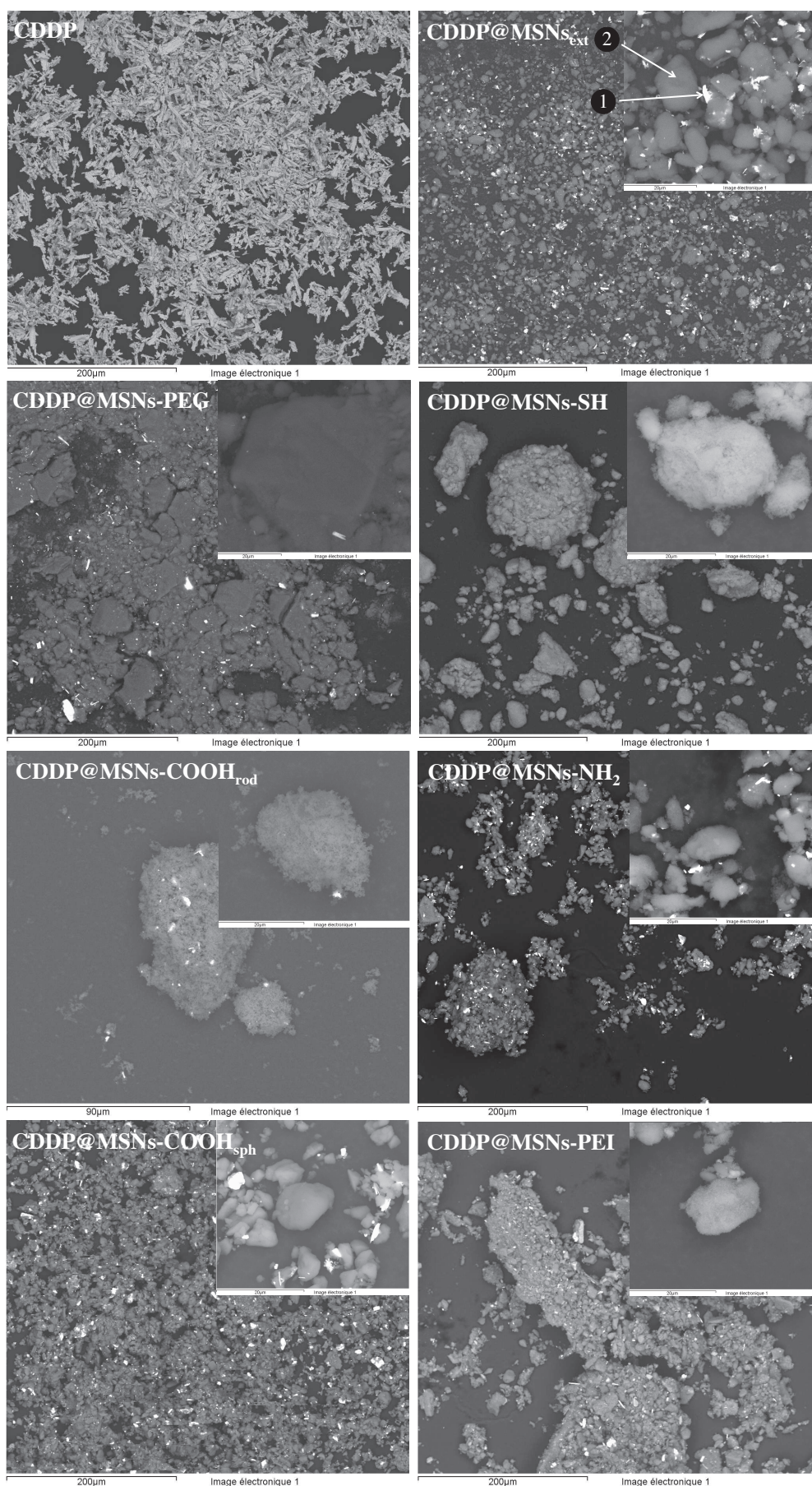


FIGURE 4.12 : Images MEB en mode électrons retrodiffusés du CDDP seul et des échantillons encapsulés puis lavés à l'éthanol.

4.3. Encapsulation du CDDP dans les MSNs

L'échantillon CDDP@MSNs-COOH_{sph} est celui qui présente le plus de platine à l'extérieur des particules puisque son rapport $(\frac{Pt}{Si})_{local}/(\frac{Pt}{Si})_{global}$ est très loin de l'unité et vaut 0,27. En revanche, la répartition du platine au sein des poudres CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs-SH est très homogène puisque les rapports $(\frac{Pt}{Si})_{local}/(\frac{Pt}{Si})_{global}$ sont proches de l'unité et valent respectivement 0,81 et 0,98. Pour ces deux échantillons, la majorité du platine est donc présent à l'intérieur des canaux des MSNs. La proportion de cristaux observés à l'extérieur des particules (Figure 4.12) pour la poudre CDDP@MSNs-PEI est donc négligeable. Pour les autres poudres, la répartition du platine est variable puisque les rapports $(\frac{Pt}{Si})_{local}/(\frac{Pt}{Si})_{global}$ se situent entre 0,32 et 0,59.

Ces résultats montrent que le cisplatine qui n'a pas été encapsulé dans le réseau poreux, n'a pas été complètement éliminé par les lavages à l'éthanol. Au regard des taux de platine déterminés de manière globale et locale, les échantillons MSNs-SH@CDDP et MSNs-PEI@CDDP sont intéressants puisque les quantités présentes à l'extérieur des particules sont négligeables.

4.3.4 Caractérisation des échantillons encapsulés par spectroscopie Raman et microscopie électronique en transmission

Les spectres Raman du CDDP_(s) et des particules encapsulées ainsi que les positions et les assignations sont présentés entre 100 et 700 cm⁻¹ sur les Figures 4.13(a) et 4.13(b) [499–502].

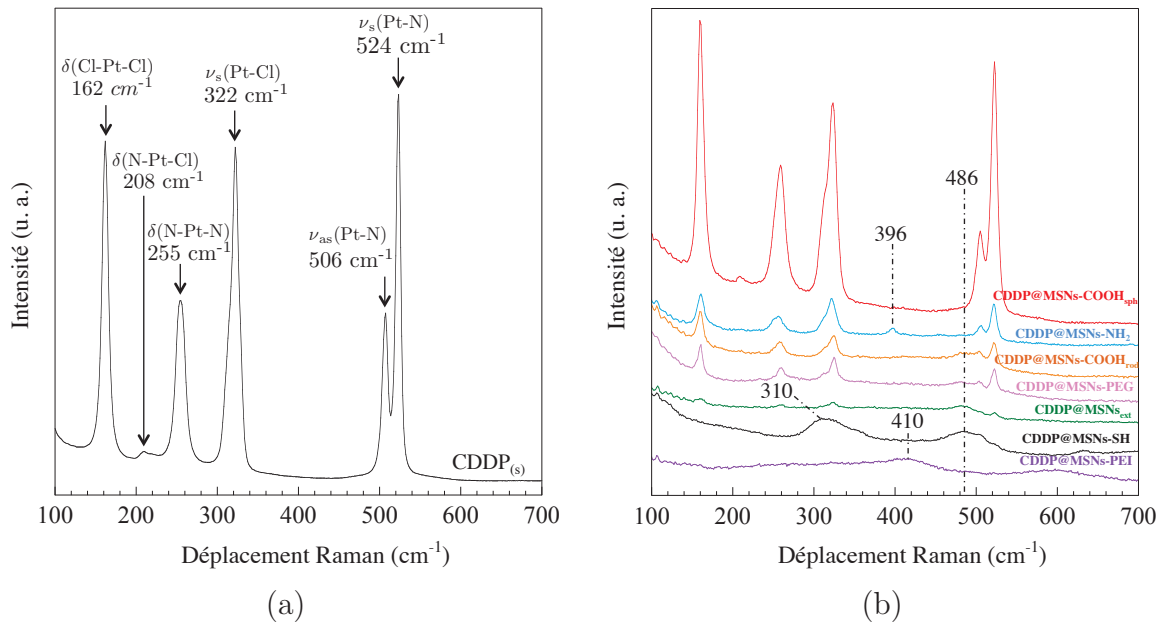


FIGURE 4.13 : Spectres Raman du CDDP_(s) (a) et des particules encapsulées (b). Longueur d'onde d'excitation du laser $\lambda = 785 \text{ nm}$.

À l'exception des échantillons CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs-SH, toutes les bandes de vibration caractéristiques du CDDP sont retrouvées sur les spectres des échantillons encapsulés. Ces signatures sont représentatives du CDDP présent soit à l'intérieur des canaux des particules, soit à l'extérieur des particules.

4. Encapsulation du cisplatine et comportement en présence de cellules en culture

Le spectre Raman de l'échantillon CDDP@MSNs-SH présentent deux bandes de vibration très larges à 310 cm^{-1} et 486 cm^{-1} . La première bande est assimilée à la vibration d'élongation de la liaison Pt-S, confirmant ainsi la formation du complexe, tandis que la deuxième bande est caractéristique de la présence de défauts au sein du matériau ($\nu(\text{SiO}_4)(\text{D1})$ [158, 380]). Cette dernière bande se retrouve aussi sur la majorité des spectres des échantillons encapsulés, dès lors que la bande de vibration associée à la présence du CDDP à 506 cm^{-1} n'est pas trop intense.

Sur le spectre Raman de l'échantillon CDDP@MSNs-PEI, les bandes de vibration caractéristiques du CDDP ne sont plus retrouvées. Deux nouvelles bandes très larges apparaissent à 410 cm^{-1} et 600 cm^{-1} . Ces bandes de vibration doivent être la signature caractéristique d'un complexe formé entre le cisplatine et les amines puisqu'un pic peu intense à 396 cm^{-1} se retrouve aussi sur le spectre de l'échantillon CDDP@MSNs-NH₂. Pour l'échantillon CDDP@MSNs-PEI, cette bande est plus large probablement parce que les complexes formés avec les différentes amines (primaires, secondaires et tertiaires) sont de nature légèrement différentes. La littérature étant très pauvre à ce sujet, des études complémentaires sont nécessaires afin de comprendre *quels complexes peuvent générer ces bandes de vibration*.

La disparition des pics Raman caractéristiques du CDDP pour les échantillons CDDP@MSNs-SH et CDDP@MSNs-PEI peut être directement corrélée à la forme dans laquelle se trouve le CDDP au sein des MSNs. En effet, les caractérisations par MET en mode balayage et annulaire champ sombre à grand angle (STEM-HAADF) de la Figure 4.14 montrent que le CDDP n'est pas sous la forme de nanocristaux pour ces deux échantillons, contrairement à ce qu'il est observé pour les échantillons CDDP@MSNs_{ext} et CDDP@MSNs-PEG (flèches blanches). En effet, pour les échantillons CDDP@MSNs-SH et CDDP@MSNs-PEI, nous n'observons pas de différence de contraste sur les images STEM-HAADF (Figure 4.14). De plus, les cartographies élémentaires atomiques EDS de l'élément platine de la Figure 4.15 montrent qu'il est distribué de manière uniforme au sein des particules. Ainsi, nous avons plutôt des agrégats moléculaires, générant une répartition homogène du platine au sein des particules.

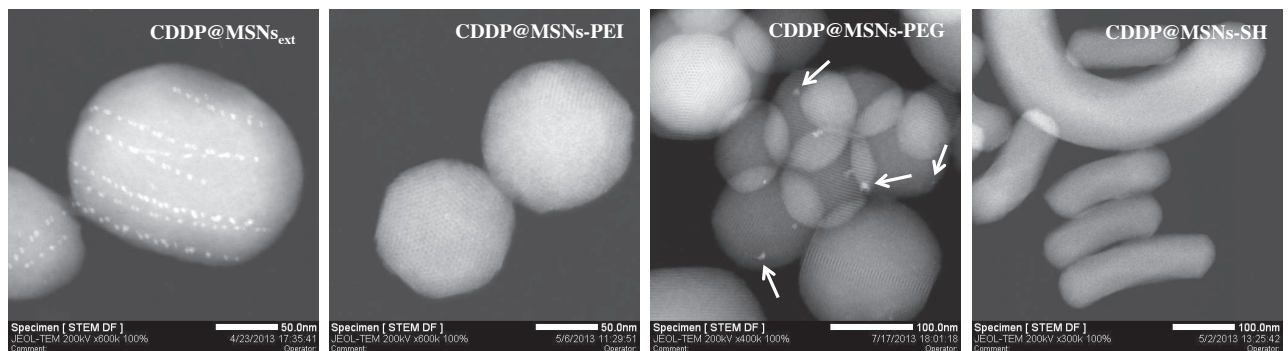


FIGURE 4.14 : Micrographies STEM-HAADF des échantillons CDDP@MSNs_{ext}, CDDP@MSNs-PEI, CDDP@MSNs-PEG et CDDP@MSNs-SH.

4.4. Comportement des CDDP@X en milieu de culture : test de libération du CDDP

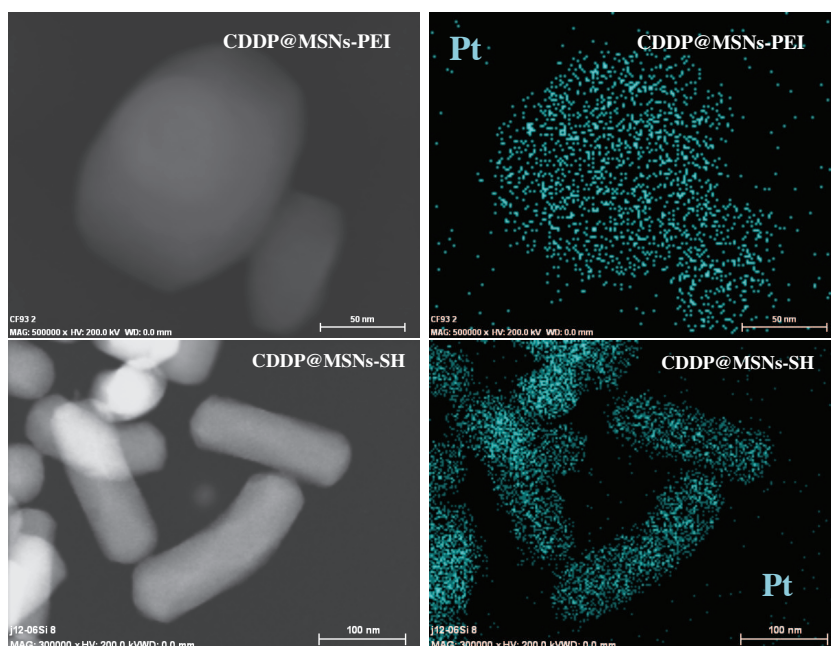


FIGURE 4.15 : Images STEM-HAADF et cartographies EDS du platine pour les échantillons CDDP@MSNs-SH et CDDP@MSNs-PEI.

4.4 Comportement des CDDP@X en milieu de culture : test de libération du CDDP

Afin d'étudier la cinétique de libération du CDDP (ou des espèces à base de platine) présent au sein des différentes MSNs, des tests de libération ont été réalisés pour chaque type de particules dont les taux d'encapsulation ont été présentés précédemment.

4.4.1 Conditions expérimentales

Chaque échantillon est mis en suspension dans une solution aqueuse de NaCl à 10^{-3} M à l'aide des ultrasons. Les préparations sont réalisées de sorte que la concentration en silice soit la même dans toutes les suspensions (4 mg/mL). Puis, 2,5 mL de ces suspensions sont introduits dans une membrane de dialyse caractérisée par une valeur seuil de poids moléculaire d'environ 12 - 14 kDa et rincée préalablement avec la solution de NaCl à 10^{-3} M afin d'éliminer les traces de certains contaminants (métaux lourds, composés soufrés) [340]. La membrane est ensuite plongée dans 47,5 mL de milieu de culture RPMI maintenu à 37 °C. La cinétique de libération a été mesurée en prélevant 500 μ L du milieu de culture pour différents temps. Le temps $t = 0$ correspond au moment où les particules encapsulées sont redispersées dans la solution de NaCl à 10^{-3} mol/L. Pour chaque temps, le **taux de platine** présent en solution est déterminé par ICP-AES. Les résultats sont présentés en fonction du pourcentage de la quantité de platine présente initialement dans les MSNs.

Note : pour simplifier la discussion, l'espèce libérée composée de platine sera dénommée CDDP.

4.4.2 Résultats et discussion

Les profils de libération du CDDP dans du milieu de culture RPMI à 37 °C pour les différentes MSNs encapsulées sont présentés sur la Figure 4.16.

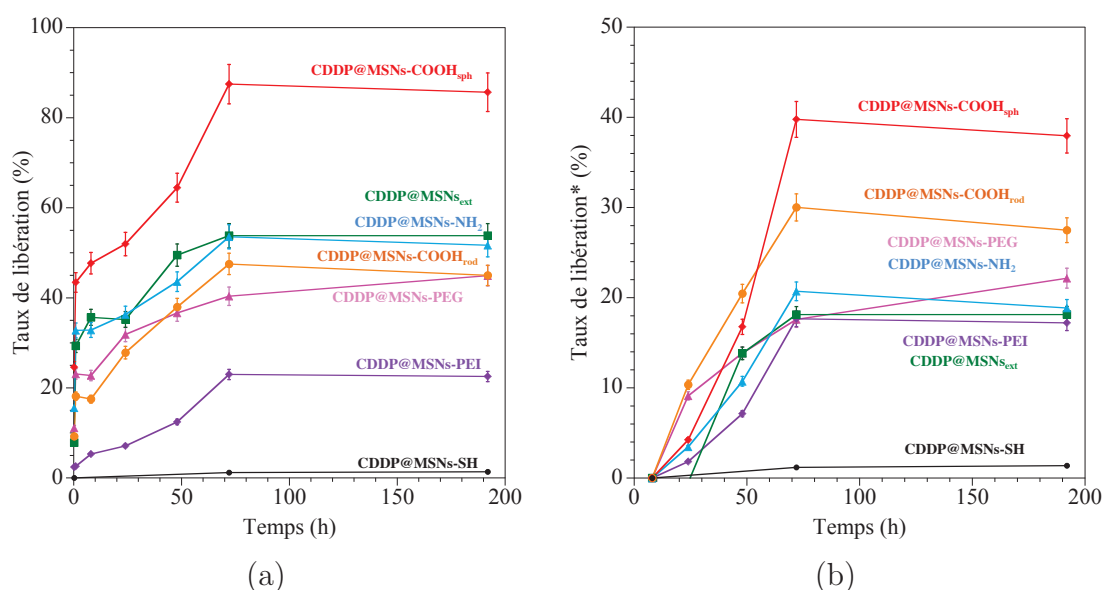


FIGURE 4.16 : Profils de libération du CDDP pour les différentes MSNs fonctionnalisées ou non. (a) Profils sur toute l'échelle de temps étudié (0 - 192 heures). (b) Profils de relargage entre 8 heures et 192 heures. *Pour chaque échantillon et chaque temps, les taux de libération à 8 heures ont été soustraits.

A l'exception des échantillons CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs-SH, tous les échantillons libèrent une grande partie du CDDP dès la première heure. Ce phénomène est appelé « burst release », littéralement « relargage prématuré », et est classique des profils de libération de substances actives par les MSNs [139, 452, 494, 503]. Après 4 heures, le pourcentage de platine libéré correspondant au « burst release » varie de 20 à 45% en fonction de l'échantillon. Une étude complémentaire (résultat non montré) indique que ce comportement est proche de celui observé pour une solution de CDDP directement injectée dans la membrane de dialyse. Ces quantités libérées aux premiers instants doivent donc correspondre au CDDP libre présent à l'extérieur des MSNs. Aux premiers instants, les échantillons CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs-SH montrent un comportement intéressant, puisqu'aucun relargage prématuré n'est observé.

A l'exception de l'échantillon CDDP@MSNs-SH, tous les échantillons montrent après 8 heures une libération progressive du CDDP en solution. Après 72 heures, la libération du CDDP s'arrête pour la majorité des échantillons à l'exception de l'échantillon CDDP@MSNs-PEG. Pour tous les échantillons, on constate qu'après 192 heures, le CDDP présent dans les particules n'a pas été libéré dans sa totalité. L'échantillon CDDP@MSNs-COOH_{sph} a libéré 85,6% du platine total, tandis que l'échantillon CDDP@MSNs-SH n'a libéré que 1,3% du platine total. Pour ce dernier échantillon, le complexe platine-soufre est trop stable pour permettre une libération dans le milieu de culture RPMI. Pour les autres échantillons, il est probable que la dégradation du réseau poreux impliquant une dissolution-précipitation de la structure silicique puisse limiter

fortement la libération du CDDP par obturation des canaux. Ajima *et al.* ont observé une libération incomplète dans du PBS en présence de nanocornes de carbone fonctionnalisées par des acides carboxyliques et « encapsulées » par du CDDP [339]. Ces auteurs ont évoqué la possibilité que les trous des nanocornes de carbone fonctionnalisés puissent être bouchés par réaction entre l'ion sodium et les fonctions carboxyliques des nanocornes, formant ainsi un complexe COONa et diminuant la taille des trous de 0,8 à 0,4 nm [339].

Dans le but de s'affranchir des quantités libérées aux premiers instants, le pourcentage de CDDP libéré après 8 heures a été soustrait aux taux de libération pour les temps suivants : 24, 48, 72 et 192 heures. Les résultats sont présentés sur la Figure 4.16(b). Par rapport aux échantillons CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs-NH₂, les échantillons CDDP@MSNs-COOH_{rod} et CDDP@MSNs-PEG libèrent rapidement le CDDP. Les allures des profils de libération pour les échantillons CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs-NH₂ sont très proches. À l'exception de l'échantillon CDDP@MSNs-PEG, un palier est atteint à partir de 72 heures.

4.5 Comportement des MSNs@CDDP en présence de cellules en culture

Afin de tester l'efficacité des différentes MSNs « encapsulées » en CDDP, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur la même lignée cellulaire SW480 que celle utilisée dans les chapitres 2 et 3 (voir paragraphe 3.3.2).

4.5.1 Préparation des échantillons

Les différentes MSNs testées sont les suivantes : MSNs-SH@CDDP, MSNs-NH₂@CDDP, MSNs-COOH_{sph}@CDDP, MSNs-COOH_{rod}@CDDP, MSNs-PEI@CDDP et MSNs-PEG@CDDP. Les concentrations finales sont les suivantes : 0 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 et 200 µg/mL et sont réalisées de sorte à ce que la concentration en matériau (SiO₂ + greffon organique) soit la même pour tous les échantillons, ce qui implique que les concentrations en CDDP soient différentes pour tous les échantillons. Les cellules sont traitées par les MSNs « chargées » dans les 15 minutes qui suivent la préparation des suspensions mères à 4 mg/mL (NaCl à 10⁻³ M).

4.5.2 Test de cytotoxicité, coloration au crystal violet et expression des résultats

Les mêmes conditions opératoires que dans le chapitre 2 (voir paragraphe 2.3.5) ont été appliquées et sont résumées sur la Figure 4.17. De la même façon que pour le chapitre 2, les résultats sont exprimés en terme de pourcentage de cytotoxicité calculé à partir des densités optiques (DO)_{puits} et (DO)_{témoin}.

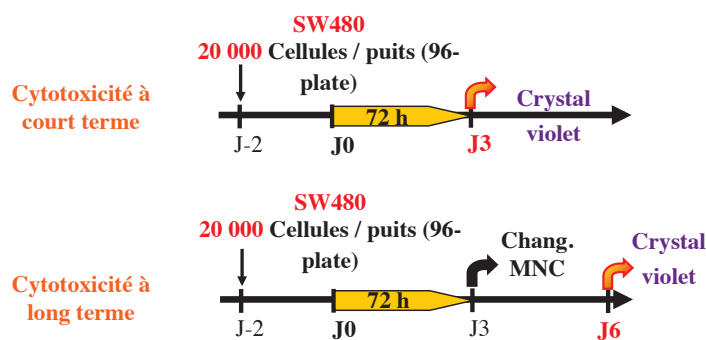


FIGURE 4.17 : Conditions opératoires utilisées lors des tests de cytotoxicité avec les MSNs fonctionnalisées.

4.5.3 Résultats et discussion

Les cytotoxicités et les valeurs des IC_{50} en fonction de la concentration en matériau, pour les deux conditions de temps et pour les différentes MSNs « encapsulées » sont représentées sur la Figure 4.18 et dans le Tableau 4.3, respectivement.

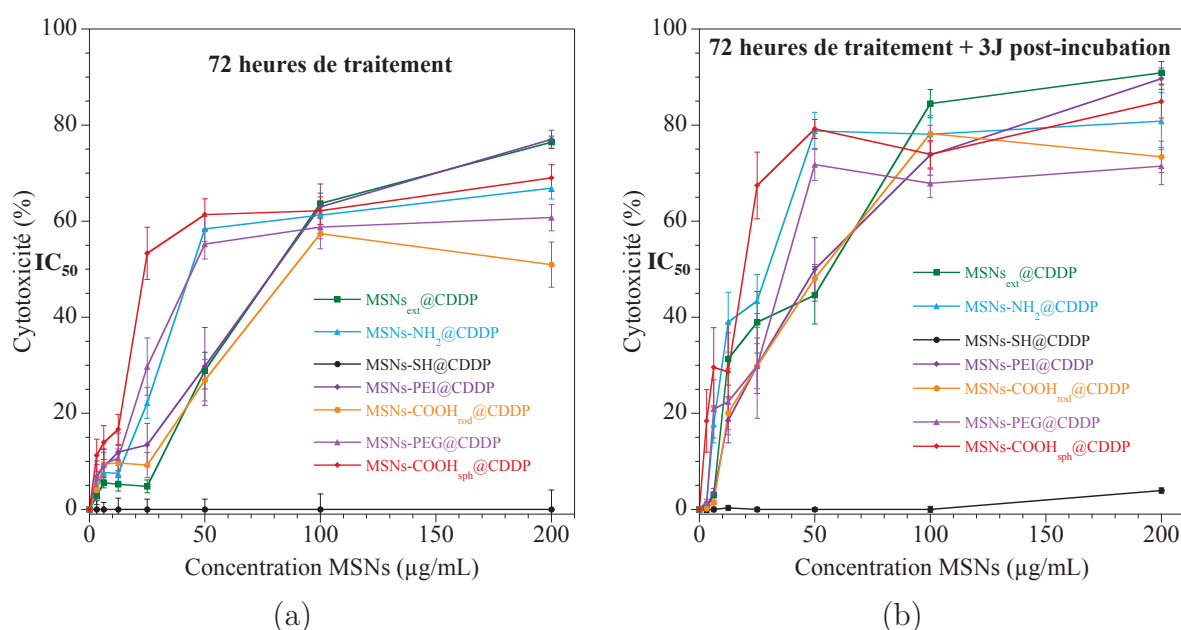


FIGURE 4.18 : Cytotoxicité des différentes MSNs encapsulées par du CDDP après 72 heures de traitement (a) et après 3 jours de post-incubation supplémentaires (b).

TABEAU 4.3 : Valeurs des IC_{50} pour les différentes MSNs « chargées » après 72 heures de traitement ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires.

Echantillon	IC_{50} (72 h) ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} (72 h + 3J) ($\mu\text{g/mL}$)
CDDP@MSNs _{ext}	75 ± 8	49 ± 18
CDDP@MSNs-NH ₂	56 ± 4	23 ± 11
CDDP@MSNs-PEI	75 ± 21	54 ± 19
CDDP@MSNs-COOH _{rod}	69 ± 6	42 ± 21
CDDP@MSNs-PEG	58 ± 18	31 ± 11
CDDP@MSNs-COOH _{sph}	26 ± 6	16 ± 3

4.5. Comportement des MSNs@CDDP en présence de cellules en culture

L'échantillon CDDP@MSNs-COOH_{sph} présente la cytotoxicité la plus élevée pour les plus faibles doses avec une IC₅₀ égale à (26 ± 6) $\mu\text{g/mL}$ après 72 heures de traitement. Les échantillons les plus faiblement cytotoxiques sont les CDDP@MSNs_{ext}, CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs-COOH_{rod}. Après 72 heures de traitement, leurs IC₅₀ valent environ 70 $\mu\text{g/mL}$. L'échantillon CDDP@MSNs-SH n'induit pas de cytotoxicité, et ce, quelles que soient les concentrations utilisées. Après 3 jours de post-incubation supplémentaires, les cytotoxicités sont toutes plus importantes, ce qui est caractérisé par une diminution d'environ 30% des IC₅₀ et une augmentation de la cytotoxicité maximale.

Les résultats de cytotoxicité peuvent être également présentés en fonction des taux de CDDP des différentes MSNs et comparés directement à la cytotoxicité du CDDP seul (Figure 4.19).

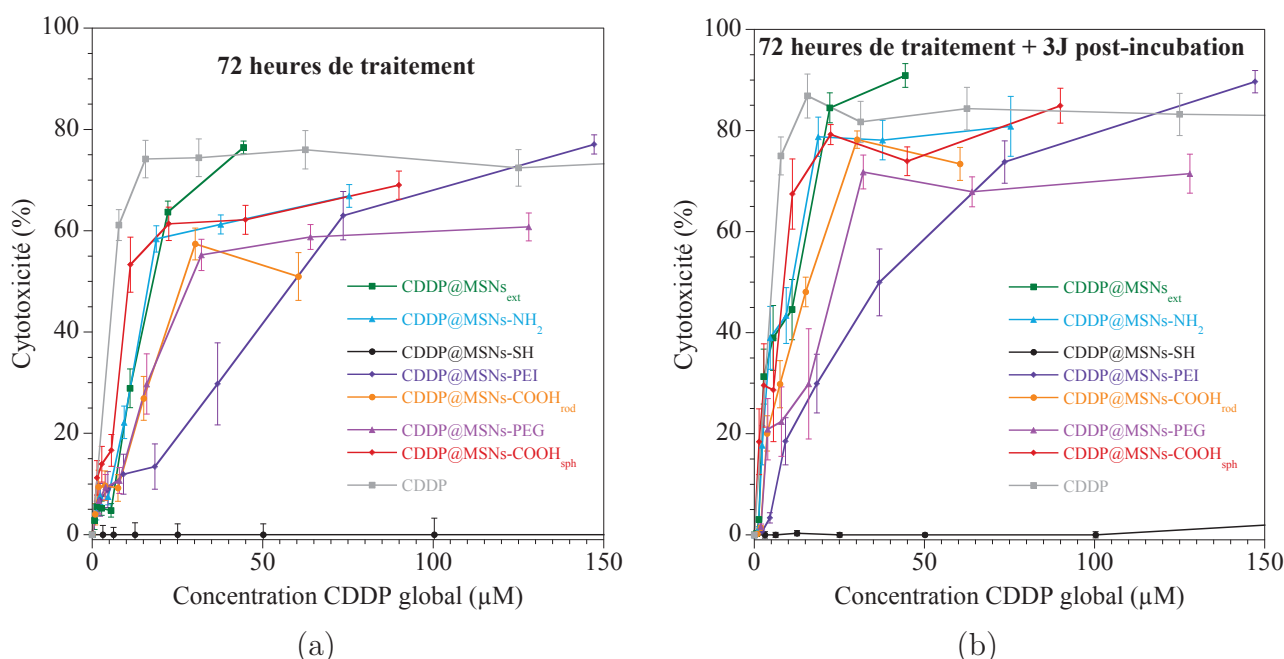


FIGURE 4.19 : Cytotoxicité des différentes MSNs après 72 heures de traitement (a) ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires (b) exprimées en fonction de la concentration initiale de CDDP dans les différentes MSNs.

Après 72 heures de traitement, les cytotoxicités des échantillons CDDP@MSNs-PEI et CDDP@MSNs_{ext} sont au moins aussi intéressantes que celle du CDDP seul. Une post-incubation de 3 jours permet d'obtenir des cytotoxicités supérieures à celle du CDDP seul. Pour les échantillons CDDP@MSNs-COOH_{sph} et CDDP@MSNs-NH₂, la post-incubation de 3 jours permet d'augmenter leur cytotoxicité à un niveau quasi-identique à celui du CDDP seul. Au vue de ces résultats, il serait intéressant d'envisager des temps d'analyse plus longs, comme par exemple 1 semaine après le traitement.

Sur la Figure 4.20, les cytotoxicités des différentes MSNs encapsulées sont présentées en fonction de la concentration en CDDP libéré après 72 heures (Figure 4.20(a)) et en fonction du taux de libération après 72 heures (Figure 4.20(b)).

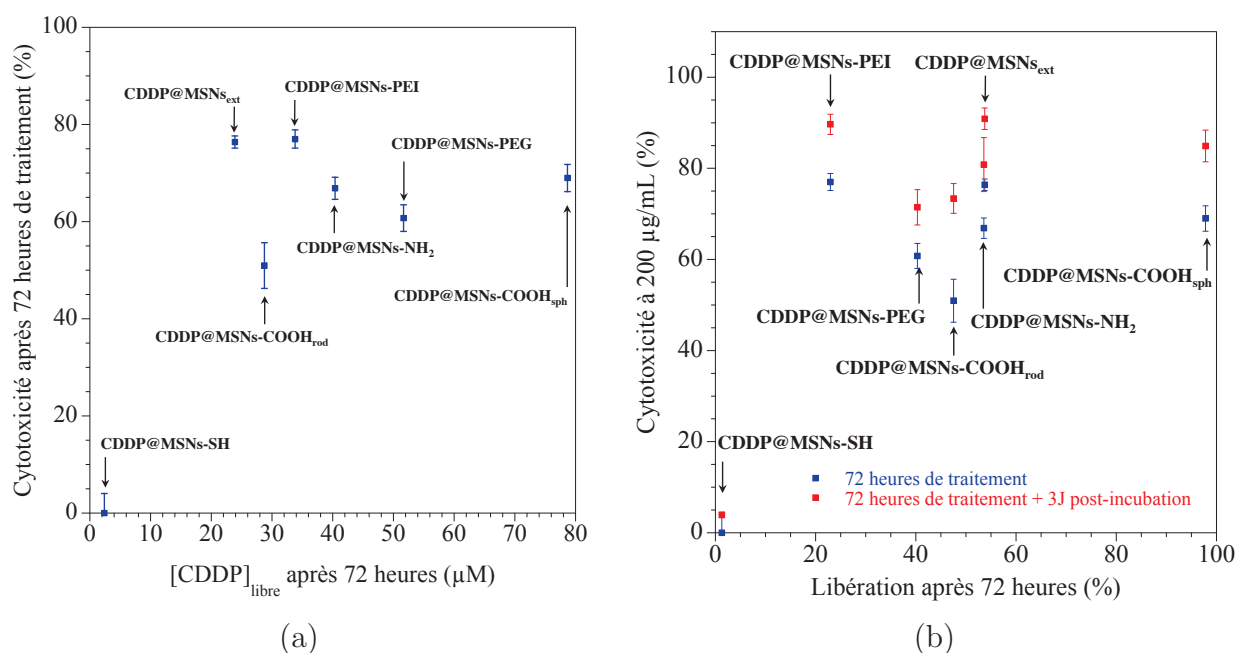


FIGURE 4.20 : Évolution de la cytotoxicité prise à 200 µg/mL pour les différentes MSNs encapsulées en fonction (a) de la concentration en CDDP libre à 72 heures et (b) du taux de libération après 72 heures.

Que ce soit en fonction de la concentration en CDDP ou du taux de libération, il n'y a pas de corrélation entre les cytotoxicités des différentes MSNs encapsulées. L'échantillon CDDP@MSNs_{ext} est le plus cytotoxique pour la concentration en CDDP libérée la plus faible. Avec le plus faible taux de libération après 72 heures (20%), l'échantillon CDDP@MSNs-PEI est le plus cytotoxique.

Pour finir, malgré un taux d'encapsulation important l'échantillon CDDP@MSNs-SH n'induit pas de cytotoxicité, et ce, quels que soient le temps de traitement et les concentrations utilisées.

4.6 Conclusion

Une méthode d'analyse par spectrophotométrie a été développée pour déterminer la concentration de CDDP en solution aqueuse. Cette méthode montre que l'adsorption du CDDP sur les MSNs fonctionnalisées, dépend fortement de la nature du greffon organique et donc de son affinité chimique pour le cisplatine. Les quantités équivalentes de CDDP ont également été déterminées par ICP-AES et sont en excellente adéquation avec ceux obtenus par spectrophotométrie. Les taux d'adsorption sont faibles par rapport aux taux de greffage des MSNs, et ce probablement à cause de l'inaccessibilité d'une partie des greffons.

Afin d'augmenter les taux de chargement en CDDP, une méthode d'encapsulation par imprégnation a été mise en place et a permis d'augmenter considérablement ces taux par rapport à ceux obtenus par adsorption. En revanche, la procédure de lavage mise en place n'a permis d'éliminer que partiellement le CDDP cristallisé à l'extérieur des canaux des particules.

En fonction des groupements fonctionnels, il est montré que le CDDP se trouve sous la

4.6. Conclusion

forme de nanocristaux ou d'espèces moléculaires présentant des caractéristiques spectroscopiques différentes du CDDP.

Les profils de libération du CDDP réalisés dans un milieu de culture biologique à 37 °C ont mis en évidence que le CDDP présent à l'extérieur des particules induit une libération rapide aux premiers instants, ce qui peut être préjudiciable lorsque l'on souhaite diminuer les effets secondaires de l'anticancéreux. Néanmoins, les nanoparticules fonctionnalisées en surface par un polyélectrolyte cationique, la polyéthylèneimine, présentent un comportement très intéressant car la libération du CDDP se fait de manière progressive.

Les tests de cytotoxicité *invitro* réalisés sur les nanoparticules encapsulées en CDDP ont montré des comportements comparables à ceux du CDDP seul.

Pour finir, malgré un taux de chargement important, les nanoparticules présentant des fonctions thiolées n'induisent pas d'effets cytotoxiques, et ceci est cohérent avec le fait qu'elles ne libèrent pas l'anticancéreux même après 1 semaine d'incubation.

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était d'étudier les conditions de synthèse et de fonctionnalisation de Nanoparticules Mésoporeuses de Silice (MSNs) de type MCM-41 ainsi que d'évaluer le potentiel de ces nanoparticules en tant que nanovecteurs pour la délivrance contrôlée d'un agent anticancéreux, le cisplatine.

Dans un premier temps, une étude paramétrique a été menée pour trouver les meilleures conditions de synthèse (en s'appuyant sur le protocole de synthèse proposé par Cai *et al.* [100]) des nanoparticules mésoporeuses de silice de type MCM-41 par hydrolyse et condensation d'un précurseur organométallique de silice, le TEOS, en milieu basique et en présence d'une solution diluée d'un tensioactif cationique, le CTAB. L'étude a porté sur l'influence de la concentration en soude, de la vitesse d'agitation et de la température. Ces paramètres ont montré une grande influence aussi bien sur les propriétés morphologiques que structurales et texturales des objets formés. En effet, des nanoparticules mésoporeuses de silice de type MCM-41 ne sont obtenues que dans une gamme de concentration en soude très étroite (entre 12,5 mM et 25 mM). Dans ce domaine de concentration, la taille des nanoparticules évolue de 80 nm à 600 nm. En revanche, la surface spécifique et le volume poreux restent constants à 1100 m²/g et 1,0 cm³/g, respectivement. Pour une concentration en soude inférieure à 12,5 mM, les matériaux obtenus correspondent à un gel constitué d'agrégats mésoporeux dont la structure est désordonnée (vermiculaire). Au-dessus de 25 mM en soude, des particules submicroniques et super-microporeuses sont formées. A notre connaissance, l'influence du pH sur les propriétés morphologiques, structurales et texturales des MSNs synthétisées en se basant sur la méthode développée par Cai *et al.* [100] n'avait jamais été étudiée de façon aussi détaillée et systématique.

L'étude portant sur l'influence de la vitesse d'agitation a montré qu'une vitesse minimum de 400 tours/min est nécessaire pour obtenir des nanoparticules sphériques de type MCM-41. En dessous de cette valeur seuil, le milieu réactionnel n'est plus suffisamment homogène et des particules asymétriques sont formées. Le dernier paramètre étudié est la température. Celle-ci ne doit pas dépasser 90 °C pour éviter une dégradation de la structure poreuse.

Cette étude a montré aussi que, les MSNs de type MCM-41, quelles que soient les conditions de synthèse, ne sont pas stables dans le milieu de synthèse. Ce comportement a été attribué à la présence en solution d'ions carbonates et/ou d'éthanol qui génèrent des ponts interparticulaires. Pour éliminer ces composés, un balayage d'azote a été utilisé pendant la synthèse. Une suspension stable pendant plusieurs mois de MSNs a ainsi été obtenue dans le milieu de synthèse. Il en

résulte dans le même temps une diminution du taux de condensation des nanoparticules. Une étape de vieillissement en milieu neutre doit alors être ajoutée pour renforcer la structure silicique des nanoparticules et retrouver le taux de condensation des nanoparticules obtenues lors de la synthèse sans flux d'azote.

Afin de libérer la porosité, une méthode d'extraction en milieu alcoolique en présence de nitrate d'ammonium est apparue comme la plus adaptée. L'efficacité de cette méthode a été évaluée par spectroscopie Raman. Pour cela, l'intensité d'une bande caractéristique du CTAB a été mesurée puis normalisée par rapport à une bande caractéristique de la silice. Cette méthode de quantification s'est avérée sensible, rapide et reproductible. A notre connaissance, cette démarche quantitative n'a jamais été développée dans le cadre de nanoparticules mésoporeuses de type MCM-41.

La stabilité de la structure poreuse des MSNs dans le temps est un point crucial en vue de l'application biomédicale. Malgré l'étape de renforcement, les caractéristiques structurales des nanoparticules sont altérées au cours du temps lorsque les nanoparticules, dépourvues de l'agent structurant, sont conservées sous atmosphère normale. La lyophilisation ne permet pas non plus de conserver les nanoparticules mésoporeuses puisque l'étape préalable de surgélation dégrade la structure poreuse des nano-objets. Il est donc nécessaire de conserver les nanoparticules soit sous vide dynamique ou statique si elles sont poreuses soit sous atmosphère normale si elles contiennent le tensioactif.

Dans la perspective de contrôler la cinétique de libération et le taux d'encapsulation du cisplatine, différentes fonctions organiques ont été introduites au sein des nanomatériaux par co-condensation. Les nanoparticules fonctionnalisées possèdent une surface spécifique élevée, un volume poreux important et un arrangement hexagonal 2D des canaux caractéristique de la structure de type MCM-41. Les caractérisations physico-chimiques ont permis de mettre en évidence la présence des groupements fonctionnels au sein des nanoparticules mais aussi de déterminer les taux de greffage.

La fonctionnalisation de la surface des nano-objets par un polyélectrolyte ou un polymère neutre a également été étudiée par une procédure en deux étapes. La présence de ces polymères n'a pas permis d'améliorer de façon durable la stabilité des nanoparticules dans une solution aqueuse dont la force ionique est comparable à celle du milieu physiologique, bien que l'efficacité du greffage ait été confirmée notamment par spectroscopie infrarouge.

A chaque stade d'élaboration des nanoparticules, des tests de cytotoxicité *in vitro* ont été réalisés sur une lignée de cellules cancéreuses de côlon humain SW480. Ainsi, les nanoparticules poreuses non fonctionnalisées n'ont pas révélé de cytotoxicité jusqu'à une concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$, concentration deux fois plus élevée que celle habituellement rencontrée dans la littérature (100 $\mu\text{g/mL}$) [12]. Le contrôle des conditions d'extraction du tensioactif a constitué une étape clé dans l'obtention de ce résultat. Cette absence de cytotoxicité

in vitro a également été observée jusqu'à 200 $\mu\text{g/mL}$ pour des nanoparticules poreuses fonctionnalisées. L'internalisation de ces nano-objets a été étudiée par microscopie confocale. Cette étude a montré que l'internalisation des nanoparticules dépendait fortement du temps de mise en contact entre les MSNs et les cellules cancéreuses. Celle-ci serait maximale après 4 heures.

L'adsorption et l'encapsulation du cisplatine par post-imprégnation d'une solution aqueuse de CDDP dans les MSNs fonctionnalisées a été étudiée. La nécessité de connaître précisément la concentration de CDDP en solution aqueuse nous a amené à mettre au point une méthode de dosage spectrophotométrique par complexation qui s'est avéré être extrêmement fiable et sensible. Cette étude a montré que les quantités de cisplatine adsorbées dépendaient fortement du groupement fonctionnel présent en surface des nanoparticules. Afin d'optimiser les quantités de cisplatine adsorbées sur les MSNs fonctionnalisées, une méthode d'imprégnation a été mise au point et a permis d'obtenir des taux d'encapsulation très élevés pouvant atteindre jusqu'à 10% en masse. La caractérisation par microscopie électronique à balayage des MSNs encapsulées a permis de déterminer l'homogénéité du platine au sein des particules. Elle a révélé que dans certains cas, une partie du CDDP est présente à l'extérieur des canaux des MSNs. En fonction des groupements fonctionnels, la microscopie électronique en transmission a également montré qu'en fonction de la nature du groupement, l'espèce encapsulée peut se présenter sous la forme de nanocristaux de CDDP ou sous la forme d'espèces moléculaires présentant des propriétés spectroscopiques différentes de celles du CDDP.

Les profils de libération du CDDP réalisés dans un milieu de culture biologique RPMI à 37°C ont montré que le CDDP présent à l'extérieur des particules provoque une libération élevée aux premiers instants qui peut être préjudiciable lorsque l'on souhaite diminuer les effets secondaires de l'anticancéreux. Ces travaux ont montré que les cinétiques de libération dépendent fortement des groupements fonctionnels présents au sein du nanomatériau. Dans ce cadre, les nanoparticules greffées à la surface externe par la polyéthylèneimine ont présenté une cinétique de libération intéressante car aucun relargage prématuré n'est observé. Enfin, les tests de cytotoxicité *in vitro* des nanoparticules encapsulées indiquent des comportements cytotoxiques comparables à ceux du CDDP seul.

Perspectives de ce travail

Les résultats obtenus lors de ces travaux ouvrent un grand nombre de perspectives pour l'étude de ces nanomatériaux hydrides pour la vectorisation du cisplatine.

Tout d'abord, il serait intéressant d'optimiser les conditions de greffage des polymères en surface des nanoparticules afin de les stabiliser en conditions physiologiques. Par exemple, des polymères de masse molaire plus faible pourraient être utilisés afin d'augmenter le taux de greffage. Des polymères neutres de type dendritique ou copolymère peigne seraient également adaptés dans la mesure où la stabilisation par voie stérique est plus élevée que pour des polymères linéaires. En plus d'étudier la stabilité colloïdale des MSNs dans des milieux biologiques, il conviendrait d'optimiser leur stabilité texturale dans ces mêmes milieux qui conditionnent la vitesse de libération de l'agent anticancéreux.

Afin d'améliorer le **taux d'encapsulation** du CDDP dans les nanoparticules mésoporeuses, il conviendrait d'étudier l'effet de la **température** ou du **pH** de la solution aqueuse de cisplatine, paramètres qui conditionnent l'ionisation du cisplatine et des MSNs, et par conséquent leurs interactions physico-chimiques. D'autre part, ces travaux ont montré que les fonctions organiques n'étaient pas toutes disponibles pour interagir avec le CDDP. Il faudrait donc comprendre les raisons qui sont à l'origine de ce résultat de sorte à optimiser les conditions de fonctionnalisation pour que l'ensemble des groupements fonctionnels soit accessible au CDDP.

En complément de l'étude *in vitro* menée au cours de ces travaux, le dosage du platine libéré dans les cellules par les MSNs, permettrait de sélectionner la fonctionnalisation la plus adaptée pour avoir un traitement le plus efficace possible.

Par la suite, il serait également intéressant d'évaluer la biodistribution des nanoparticules au cours du temps afin de vérifier l'efficacité du greffage de polymères (furtivité des nanoparticules) et la localisation principale des MSNs au niveau de la zone tumorale.

Enfin, ces travaux ont initié des collaborations nouvelles et notamment, des travaux préliminaires ont vu le jour en partenariat avec l'équipe OMBC3 (OrganoMétallique et Catalyse pour une Chimie Bio- et éco-Compatible) de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université

de Bourgogne (ICMUB). Ce projet consiste à mettre au point un nanosystème permettant la libération de l'anticancéreux en fonction du pH. Pour ce faire, les canaux des nanoparticules de silice seront obstrués par des nanoparticules d'Oxydes de Fer SuperParamagnétiques (USPIO) et ces deux nano-objets seront liés *via* une fonction clivable par une variation du pH de **7,4** (pH du milieu sanguin) à **5,5** (pH extracellulaire des tumeurs) [263].

Annexes

A Manométrie d'adsorption/désorption d'azote

La sorption d'azote à 77 K est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour accéder aux propriétés texturales des solides poreux telles que la surface spécifique, le volume poreux, la taille des pores ainsi que leur distribution. A une température donnée, l'ensemble des états d'équilibre correspondant à des pressions comprises entre 0 et la pression de vapeur saturante de la substance adsorbable P_0 est appelée **isotherme d'adsorption**. Habituellement, l'isotherme d'adsorption obtenue expérimentalement est représentée sous forme graphique en reportant la quantité adsorbée par gramme d'adsorbant en fonction de la pression relative d'équilibre P/P_0 . L'allure des isothermes d'adsorption physique est représentative des caractéristiques texturales du matériau étudié. L'IUPAC classe ces isothermes en six catégories résumées sur la Figure A-1 [21, 349, 504] ci-dessous.

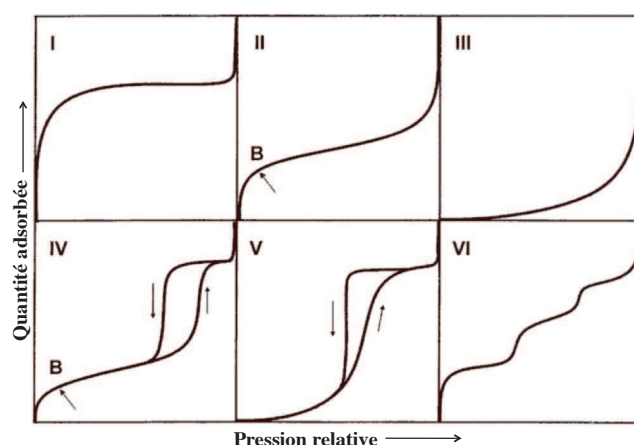


FIGURE A-1 : Classification de l'IUPAC des isothermes d'adsorption physique. D'après [21].

L'isotherme de type **I** est caractérisée par un palier de saturation malgré l'augmentation de la pression. Ce type d'isotherme est généralement retrouvée pour des matériaux **microporeux**. L'isotherme d'adsorption de type **II** se caractérise par une augmentation très progressive de la quantité adsorbée en fonction de la pression relative d'équilibre. Le type II est souvent retrouvé pour des adsorbants **non poreux ou macroporeux**. L'isotherme de type **IV** présente la même allure que l'isotherme de type II pour les basses pressions relatives mais est caractérisée par un palier de saturation à des pressions relatives élevées. Ce type d'isotherme est caractéristique des

adsorbants dans lesquels se produit une condensation capillaire. Les isothermes d'adsorption de type **III** et **V** sont caractérisées par une courbure convexe aux pressions relatives faibles. Ces isothermes sont généralement observées dans le cas de l'adsorption de vapeur d'eau par une **surface hydrophobe**. Enfin, l'isotherme de type **VI** ou isotherme à marches est caractéristique de la formation des couches adsorbées l'une après l'autre.

A.1 Méthode d'analyse expérimentale

Les isothermes d'adsorption/désorption d'azote ont été réalisées sur un appareil Micromeritics® ASAP 2020 à température de l'azote liquide (77 K). Avant l'analyse, la poudre est placée dans une cellule de mesure pour éliminer les molécules d'eau adsorbées. Ce dégazage se fait à une température inférieure au dernier traitement thermique de telle sorte à ce qu'il n'inflige aucune modification texturale du solide à analyser. Quelle que soit l'échantillon, le dégazage implique une première étape d'évacuation à 90 °C sous vide secondaire ($< 10^{-4}$ mbar) pendant 30 minutes. Puis, la poudre est chauffée pendant 4 heures sous vide secondaire soit à 90 °C (poudre extraite), soit à 350 °C (échantillon calciné). Toutes les mesures ont été effectuées sur environ 100 mg de poudre pesés à 0,1 mg près. L'isotherme d'adsorption/désorption d'azote caractéristique des MSNs de type MCM-41 est présentée sur la Figure A-2.

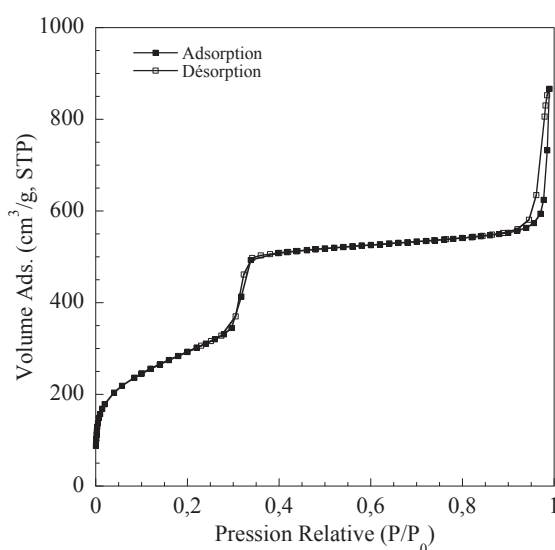


FIGURE A-2 : Isotherme d'adsorption/désorption d'azote caractéristique des MSNs de type MCM-41. Déterminée pour un échantillon calciné. Isotherme de type IV selon la classification de l'IUPAC.

Les MSNs de type MCM-41 se caractérisent par une isotherme d'adsorption/désorption de type **IV** suivie d'un palier de saturation puis d'une condensation inter-particulaire. Pour des pressions relatives inférieures à 0,3, l'allure de l'isotherme est caractéristique de l'adsorption monocouche-multicouche sur la totalité de la surface du matériau. Ce domaine nous renseigne sur la surface totale du matériau. À partir d'une pression relative d'environ 0,35, l'augmentation rapide de la quantité adsorbée traduit un phénomène de **condensation capillaire** où l'ensemble des pores d'un même diamètre est rempli à la même pression relative. Ce phénomène est traduit

par la loi de Kelvin (éq. A-1) qui permet de calculer la pression de vapeur P en fonction du rayon de courbure du ménisque liquide r_k créé :

$$\ln \left(\frac{P}{P_0} \right) = - \frac{2\gamma V_l}{r_k RT} \quad (\text{A-1})$$

avec V_l le volume molaire, γ la tension superficielle de l'azote liquide, R la constante des gaz parfaits, P_0 la pression de saturation de la vapeur d'azote concernée et T la température d'adsorption.

Pour des pressions relatives supérieures à 0,4, un palier de saturation apparaît. Enfin, pour une pression relative supérieure à 0,9, une étape de condensation a lieu et correspond au remplissage des espaces inter-particulaires.

A.2 Détermination de la surface spécifique, du diamètre des pores et du volume poreux

La détermination de la surface spécifique s'effectue en utilisant la méthode formulée en 1938 par Brunauer, Emmet et Teller [347]. Cette théorie décrit la surface comme un ensemble de sites d'adsorption possédant la même énergie d'adsorption E_1 . Chaque molécule adsorbée joue le rôle d'un nouveau site d'adsorption dans la couche suivante dont l'énergie d'adsorption est égale à l'énergie de liquéfaction de l'azote E_L . Le calcul de la surface spécifique des échantillons peut être réalisé au moyen de l'équation BET donnée ci-dessous [460, 505] :

$$\frac{P/P_0}{V_{ads}(1 - P/P_0)} = \frac{1}{V_{ml} C_{BET}} + \frac{(C_{BET} - 1)}{V_{ml} C_{BET}} \frac{P}{P_0} \quad (\text{A-2})$$

avec V_{ads} le volume d'azote adsorbé à la pression d'équilibre P (cm^3/g STP), V_{ml} le volume d'azote adsorbé correspondant la monocouche (cm^3/g STP), P_0 la pression de saturation de la vapeur d'azote concernée, C_{BET} le coefficient BET qui dépend de la chaleur molaire d'adsorption de la première couche à la surface du matériau (E_1) et de la chaleur molaire de liquéfaction de l'azote (E_L). La valeur de ce coefficient correspond en première approximation à l'équation suivante :

$$C_{BET} = \exp \left(\frac{E_1 - E_L}{RT} \right) \quad (\text{A-3})$$

En traçant l'équation (A-2) en fonction de P/P_0 dans le domaine $0,05 < P/P_0 < 0,35$ (zone de validité de l'équation qui est limitée à l'adsorption monocouche-multicouches), une droite d'équation $Y = AX + B$ est obtenue. L'ordonnée à l'origine B et la pente A de cette droite permettent d'obtenir les valeurs de C_{BET} et V_{ml} défini respectivement par $((A/B) + 1)$ et $(1/(A + B))$. A partir de la valeur de V_{ml} , la surface spécifique du solide, généralement appelée

S_{BET} (m^2/g), peut être alors calculée selon l'équation suivante :

$$S_{BET} = nN_A\sigma = \frac{V_{ml}N_A\sigma}{V_{STP}} = 4,35 \times V_{ml} \quad (\text{A-4})$$

avec n le nombre de moles de gaz contenues dans une monocouche (à savoir V_{ml}/V_{STP} soit 22,4 L/mol), N_A le nombre d'Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) et σ la surface occupée par une molécule d'azote adsorbée ($16,2 \text{ \AA}^2$ à 77 K) [506]. En pratique, le domaine de validité de l'équation BET est souvent réduit au domaine des pressions relatives $0,06 < P/P_0 < 0,25$.

Le volume total (V_t) est calculé à partir de l'isotherme d'adsorption/désorption d'azote d'après le volume gazeux obtenu (V_{ads}) à la fin du remplissage des espaces inter-particulaires ($P/P_0 \sim 0,99$) sur la branche de désorption de l'isotherme. Le volume adsorbé mesuré lors de l'analyse correspond à un volume dans les conditions STP (conditions standards de température et de pression) qu'il est nécessaire de transformer en N_2 liquide (cm^3/g), en utilisant le calcul suivant :

$$V_{m/t} = V_{ads}(\rho_g/\rho_l) \quad (\text{A-5})$$

où ρ_g et ρ_l sont les masses volumiques de l'adsorbat, respectivement à l'état gazeux et liquide. Pour l'azote à 77 K, $\rho_g/\rho_l = 1,547 \times 10^{-3}$.

Le volume mésoporeux (V_m) et la distribution de taille des mésopores est obtenue à partir de la méthode de Barret, Joyner, et Halenda, souvent appelée **méthode BJH** [507]. Elle consiste à analyser pas à pas les isothermes d'adsorption-désorption de type IV et repose sur les hypothèses suivantes [504] :

- la texture poreuse, supposé indéformable, est constituée de mésopores indépendants et de géométrie bien définie,
- l'adsorption multimoléculaire se produit sur les parois des mésopores de la même façon que sur une surface plane,
- la loi de Kelvin est supposée applicable dans les mésopores,
- la condensation capillaire se produit dans les mésopores dont les parois sont déjà recouvertes d'une couche multimoléculaire dont l'épaisseur t dépend de la pression d'équilibre
- la surface de l'adsorbant déjà recouverte de diazote adsorbé est parfaitement mouillante (angle de contact nul),
- dans le cas d'un pore cylindrique, le rayon du pore r_p est relié au rayon de Kelvin r_k par la relation $r_p = r_k + t$.

Dans le cadre de ce travail, la distribution en taille de pore (donc le diamètre des pores D_p) des MSNs synthétisées a été déterminée par cette méthode appliquée à la branche de désorption pour des pressions relatives $P/P_0 \leq 0,75$. Cette méthode repose sur l'exploitation des isothermes à l'aide d'algorithmes mathématiques que nous ne détaillerons pas ici. Un exemple complet est donné dans la référence [504].

B Diffraction de rayons X

Cette technique non destructive pour l'échantillon est basée sur la mesure de l'angle de diffraction lié au vecteur d'onde diffracté (\vec{Kd}) par les plans réticulaires d'un solide ordonné (Figure B-3).

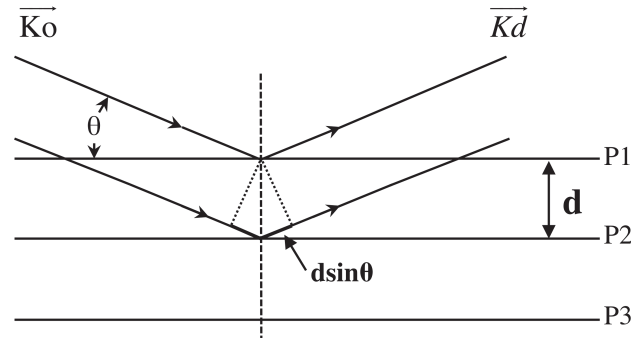


FIGURE B-3 : Diffraction des rayons X sur deux plans réticulaires.

La distance inter-réticulaire associée à une famille de plans est reliée à l'angle d'incidence, selon l'équation suivante :

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (\text{B-6})$$

où d_{hkl} est la distance entre deux plans réticulaires indexés dans le système de Miller (hkl), n l'ordre de diffraction, λ la longueur d'onde du faisceau entrant et θ l'angle d'incidence.

Dans la majorité des cas, la technique de diffraction de rayons X est utilisée sur la matière cristalline afin d'identifier les phases obtenues et d'évaluer leur cristallinité. Dans le cas des nanoparticules mésoporeuses de silice, les murs sont constitués de silice amorphe mais le matériau possède une structure globale régulière à l'échelle mésoscopique en deux dimensions ce qui permet d'observer des signaux aux bas angles et donc de déterminer le paramètre de maille (ou de périodicité) a_0 et le degré d'organisation des pores à longue distance.

Les données DRX aux bas angles ont été collectées sur un diffractomètre Bruker® D8 Advance équipé d'un détecteur PSD linéaire de type Vantec avec une anticathode au cuivre (raie $K\alpha$: $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) à une tension de 35 mV et une intensité de 35 mA (Figure B-4). Le balayage est effectué entre $0,5^\circ$ et 10° , avec un pas de $0,017^\circ$ et un temps d'acquisition à chaque pas de 3 secondes. L'échantillon est déposé sur un porte échantillon en PMMA (configuration en mode réflexion θ - θ). Le solide est irradié par un faisceau de rayons X avec une incidence rasante. Afin de limiter l'intensité du faisceau diffusé, un couteau est placé au niveau du détecteur (Figure B-4). Les diffractogrammes issus de ces mesures ont été exploités avec le logiciel DiffracPlus EVA.

Le diffractogramme de rayons X d'un MTS de symétrie hexagonale peut présenter un nombre de raies de diffraction variable selon l'organisation du matériau et la qualité de l'appareillage. Typiquement, la figure de diffraction obtenue pour un matériau de type MCM-41 après calcination (Figure B-5(a)) présente quatre pics de diffraction, indexables en symétrie hexagonale de

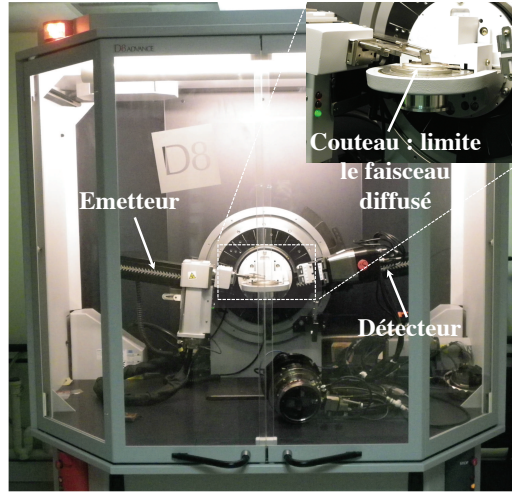


FIGURE B-4 : Diffractomètre Bruker[®] D8 Advance équipé d'un PSD linéaire de type Vantec.

groupe d'espace P6mm et correspondant aux familles de plans (100), (110), (200) et (210). La Figure B-5(b) schématise l'arrangement des canaux et permet de rendre compte de la relation entre la distance inter-réticulaire (100) et celle entre les centres des pores.

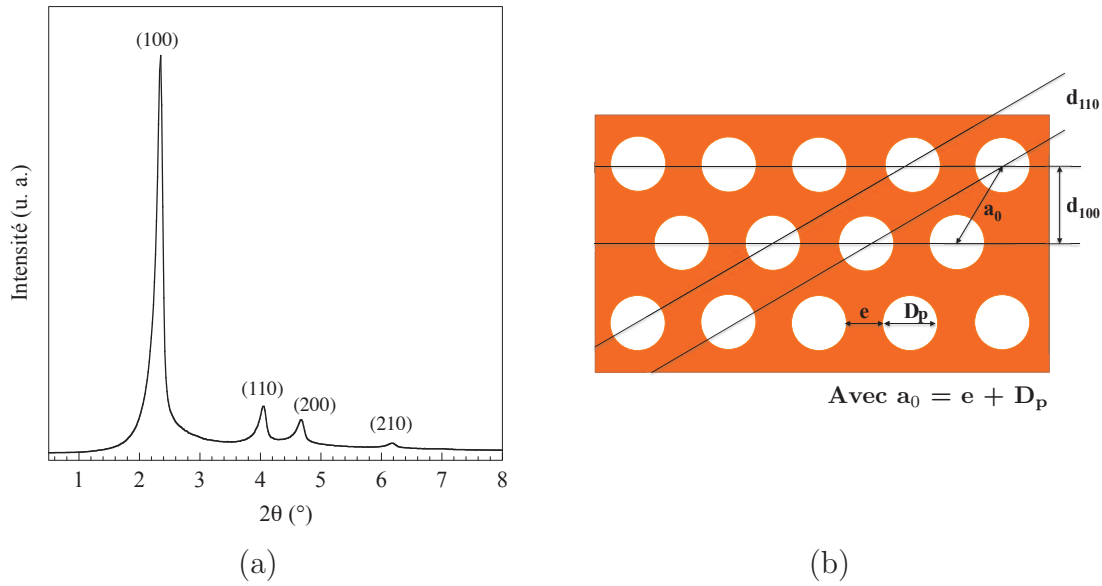


FIGURE B-5 : Diffractogramme caractéristique d'un matériau mésoporeux de type MCM-41 (a) et représentation schématique de l'arrangement hexagonal des pores (b) avec a_0 : paramètre de maille, e : épaisseur des parois, D_p : diamètre des pores et d_{hkl} : distance inter-réticulaire entre les plans de diffraction.

Le calcul des distances inter-réticulaires pour chacun des pics de diffraction permet de définir les familles de plans qui définissent le réseau hexagonal :

$$d_{100} = \sqrt{3} d_{110} \quad (\text{B-7})$$

$$d_{100} = 2 d_{200} \quad (\text{B-8})$$

$$d_{100} = \sqrt{(26/4)} d_{210} \quad (\text{B-9})$$

Pour une symétrie hexagonale, les distances inter-réticulaires peuvent être mises en relation avec le paramètre de maille a_0 selon l'éq. (B-10).

$$d_{hkl} = \frac{a_0}{\sqrt{\frac{4}{3}(h^2 + k^2 + hk)}} \quad (\text{B-10})$$

Le paramètre de maille a_0 calculé à partir de la raie la plus intense (d_{100}) sera :

$$a_0 = 2 d_{100} / \sqrt{3} \quad (\text{B-11})$$

C Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière permet la caractérisation des systèmes divisés et a pour origine la fluctuation dynamique des indices optiques d'un système hétérogène. Ces fluctuations d'indices proviennent alors des fluctuations de concentrations du milieu, principalement d'origine thermique (mouvement brownien des particules en solution). Une telle technique est utilisée pour la détermination de taille de particules comprises entre quelques nanomètres et plusieurs microns.

Lorsqu'une suspension colloïdale est illuminée par un rayonnement monochromatique de lumière visible, l'interaction entre le champ électrique du rayonnement et les molécules du milieu diffusant induit localement une polarisation oscillante. Les molécules se comportent alors comme des sources secondaires qui vont ré-émettre dans toutes les directions avec une longueur proche de celle du faisceau incident. Les ondes diffusées par chacune des particules interfèrent pour donner une intensité totale diffusée, qui est le carré de l'amplitude du champ électrique diffusé.

Si la taille des objets diffusants est très petite devant la longueur d'onde de la lumière incidente ($d < \lambda/10$), l'intensité de la lumière diffuse est alors proportionnelle au carré du volume de la particule (diffusion de Rayleigh). Lorsque la taille des particules est supérieure à $\lambda/10$, la théorie de Rayleigh ne s'applique plus. Il faut alors utiliser l'approximation de Rayleigh-Gans-Debye, qui est valable pour des particules de taille comprise entre $\lambda/20$ et λ . Pour des particules dont la taille n'est plus négligeable devant la longueur d'onde, l'intensité dépend de l'angle de diffusion (diffusion de Mie).

Sous l'effet de l'agitation thermique, la position de chaque objet diffusant varie à chaque instant, faisant varier l'intensité diffusée finale au cours du temps. L'échelle de temps de ces fluctuations dépend de la taille des objets observés. Ainsi, de petits objets produiront une intensité diffusée fluctuant vite alors que de gros objets diffusant plus lentement produiront des fluctuations d'intensité sur des échelles de temps plus longs. En diffusion dynamique de la lumière, ces fluctuations d'intensité sont utilisées au moyen d'un corrélateur. Il s'agit alors de comparer l'intensité diffusée à un instant t et à un instant $t + \tau$ (temps de corrélation). Plus τ sera petit, plus les intensités seront corrélées, plus τ sera grand moins les intensités seront corrélées entre elles (Figure C-6). D'autre part, plus les particules sont grosses, plus l'intensité changera lentement et plus la corrélation persistera sur une longue période de temps.

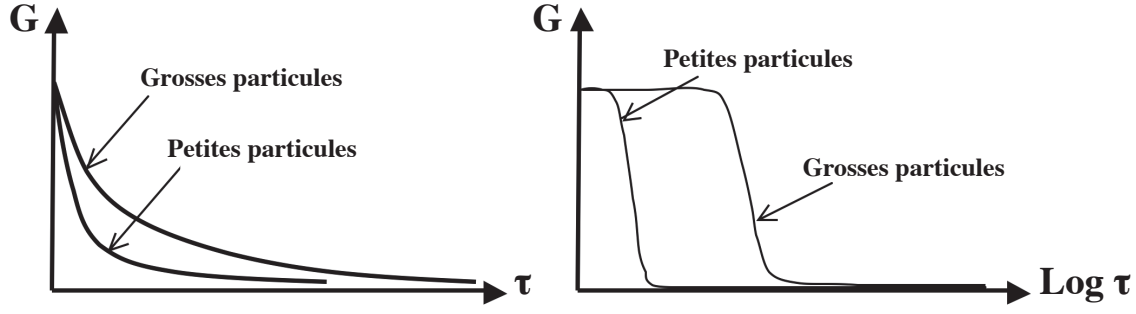


FIGURE C-6 : Fonction de corrélation de particules en fonction du temps de corrélation.

La fonction d'auto-corrélation, qui est une exponentielle décroissante et qui traduit la probabilité qu'à une particule de rester à la même place en fonction du temps est définie par l'équation suivante :

$$G(t) = \sum i(t).i(t + \tau) = \sum c_i \exp(-\gamma_i t) \quad (C-12)$$

avec τ la période d'échantillonnage du corrélateur, c_i l'intensité diffusée par les particules de taille i , $\gamma_i = Dq^2$, D le coefficient de diffusion translationnel pour les particules de taille i et q le vecteur d'onde défini par :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (C-13)$$

avec n l'indice de réfraction du milieu de suspension, λ la longueur d'onde de la source laser et θ l'angle entre la source laser et le détecteur.

A partir de la fonction d'autocorrélation, l'une des méthodes qui peut être utilisée pour calculer le diamètre hydrodynamique des particules est la méthode des cumulants :

$$\ln G(t) = a + bt + ct^2 \quad (C-14)$$

avec $b = D$ le coefficient de diffusion translationnel et $2c/b^2$ la variance de la distribution.

Lorsque les particules n'interagissent pas entre elles (en milieu fortement dilué par exemple), on peut assumer que le coefficient de diffusion D est le même que celui de l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_h} \quad (C-15)$$

où η est la viscosité du milieu de diffusion, K_B la constante de Boltzmann, T la température et D_h le **diamètre hydrodynamique** des particules diffusantes approximées de géométrie sphériques.

L'appareil utilisé est de marque Malvern[®], de type Nano-ZS. La distribution obtenue peut

être quantifiée en fonction du nombre, du volume ou de l'intensité diffusée, comme le montre le Tableau C-4 présenté ci-dessous.

TABLEAU C-4 : Définition des distributions en taille.

Appellation	Définition	Facteur pondéré
Diamètre moyen en nombre	$\bar{d}_n = \frac{\sum_i n_i d_i}{\sum_i n_i}$	Classe en nombre
Diamètre moyen en volume	$\bar{d}_v = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3}$	Classe en volume
Diamètre DDL (Z_{average})	$\bar{d}_z = \frac{\sum_i n_i d_i^6}{\sum_i n_i d_i^5}$	Intensité de la lumière diffusée

Deux méthodes de préparation des échantillons sont réalisées. Soit les particules sont caractérisées directement après synthèse. Dans ce cas, la suspension colloïdale est diluée avec un taux de dilution de 25 (solution de NaCl à 10^{-3} M) puis passée à la canne à ultrasons pendant 20 secondes à 70% de sa puissance. La mesure est ensuite effectuée trois fois. Lorsque le diamètre hydrodynamique des particules est évalué après extraction, la poudre est re-dispersée à une concentration de 1 mg/mL dans une solution de NaCl à 10^{-3} M en utilisant la canne à ultrasons à 70% de sa puissance. La mesure est réalisée trois fois.

D Diffusion électrophorétique de la lumière

Dans ce travail de thèse, des mesures de potentiels zêta en fonction du pH ont été effectuées sur les MSNs en utilisant un titrateur automatique Malvern[®] MPT-2. Cette méthode repose sur une mesure directe de la mobilité électrophorétique μ par effet Doppler pour des particules mises en mouvement sous l'action d'un champ électrique alternatif E appliqué entre deux électrodes dans une cellule fermée. Une particule chargée mise dans un champ électrique se déplace et a donc une mobilité électrophorétique μ ($\mu\text{m.cm.V}^{-1}.\text{s}^{-1}$) donnée par l'équation suivante :

$$\mu = \frac{V}{E} \quad (\text{D-16})$$

où V est la vitesse de la particule ($\mu\text{m.s}^{-1}$) et E le champ électrique (V.cm^{-1}).

Le potentiel zêta ζ se mesure à l'aide de cette mobilité électrophorétique μ d'après la loi de Henry :

$$\zeta = \frac{3\mu\eta}{2\epsilon f(\kappa r)} \quad (\text{D-17})$$

avec ϵ la constante diélectrique, η la viscosité, μ la mobilité électrophorétique, $f(\kappa r)$ la fonction de Henry, r le rayon de la particule, κ la paramètre de Debye et ζ le potentiel zêta (mV).

Expérimentalement, environ 10 mg de MSNs sont redispersées à l'aide des ultrasons dans 12 mL d'une solution de NaCl à 10^{-2} M. Le pH de la suspension est ensuite ajusté à 2,5 avec une solution d'HCl à 1 M. La force ionique est maintenue constante (solution de NaCl à 10^{-2} M) afin de s'affranchir du problème de variation de la couche diffuse (κ^{-1}). Les pHs s'échelonnant de pH = 3 à pH = 10, la concentration maximale en H^+ et en OH^- ne dépasse pas 10^{-3} M, ce qui permet d'éviter le changement de force ionique pour cette gamme de pH.

E Caractérisations spectroscopiques

E.1 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du ^{29}Si à l'état solide

Dans le cadre de ce travail, la RMN ^{29}Si à l'état solide a permis d'identifier et de quantifier les espèces siliciques présentes au sein du matériau. Grâce à cette technique, il a été possible de déterminer le taux de condensation, le taux de silanols par silicium ainsi que de confirmer le greffage d'organosilanes.

Deux techniques ont été utilisées. D'une part, la rotation à l'angle magique (MAS) qui a été conçu par Andrew *et al.* [508] et Lowe *et al.* [509] et qui consiste à faire tourner le rotor contenant l'échantillon à une fréquence allant de quelques centaines à quelques dizaines de milliers de Hz autour d'un axe incliné par rapport à la direction du champ magnétique B_0 d'un angle θ égal à $54^\circ 44'$ (Figure E-7) Cette méthode présente l'avantage de supprimer les interactions dipolaires anisotropiques qui sont responsables de l'élargissement des raies observables.

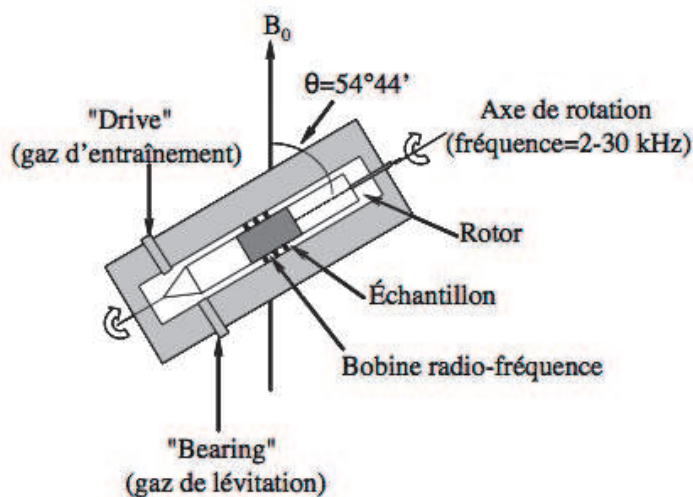


FIGURE E-7 : Schéma de principe d'une sonde MAS. D'après [510].

D'autre part, la séquence CPMAS combine la technique précédemment décrite avec une polarisation croisée : les noyaux de spin abondants (typiquement les protons 1H sont polarisés, puis cette polarisation est transférée sur les noyaux de spin plus dilués (typiquement ^{29}Si). Cette technique augmente fortement la qualité du signal, mais les spectres obtenus présentent des

pics dont l'intensité dépend de l'efficacité du transfert. La technique CP-MAS permet ainsi une analyse qualitative, alors que la MAS est bien qualitative.

Les mesures en RMN solide ont été réalisées sur un spectromètre Bruker[®] ASX 400 dans les services spécialisés de l'Institut Charles Gerhard (ICG) de Montpellier par Monsieur Philippe Gaveau. Les conditions d'acquisition sont résumées dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU E-5 : *Conditions d'enregistrement des spectres RMN.*

Paramètres	²⁹ Si	²⁹ Si
Séquence	CPMAS	MAS + DEC ^a
Fréquence de résonance (MHz)	79,49	79,49
Vitesse de rotation du rotor (kHz)	10	10
Angle d'impulsion	$\pi/6$	$\pi/6$
Durée de l'impulsion (μ s)	2	5
Délai de recyclage (s)	5	60
Sonde utilisée (mm)	7,5	7,5
Temps de contact (μ s)	3000	-

^aDEC : Découplage des protons.

Les décompositions des spectres RMN réalisées dans le but de déterminer la proportion des espèces correspondantes ont été effectuées avec le logiciel DMfit [357].

Différentes conditions d'enregistrement des spectres RMN ²⁹Si MAS découplés protons ont été testées. L'influence du temps de relaxation (30, 60, 120 et 240 secondes) sur les proportions des différentes espèces a été étudiée. Pour ce faire, différentes analyses en utilisant des temps de relaxation de 30, 60 120 et 240 secondes ont été réalisées. Sur le Tableau E-6, les proportions des espèces pour les temps de relaxation de 60 et 240 secondes sont présentées.

TABLEAU E-6 : *Qⁿ (%) déterminé pour un échantillon après synthèse analysé pour deux délais de recyclage.*

Délai de recyclage	Q ² (%)	Q ³ (%)	Q ⁴ (%)
60 s	5	42	53
240 s	6	40	54

Les résultats reportés dans le Tableau E-6 montrent que l'augmentation du délai de recyclage a peu d'effet sur les résultats de la décomposition du spectre (%Qⁿ) qui restent dans le domaine d'erreur égal à 5%. Par conséquent, c'est avec un délai de recyclage de 60 secondes que tous les spectres présentés dans cette thèse ont été obtenus.

E.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier est une méthode d'analyse qui utilise un rayonnement dans la gamme Infrarouge des radiations électromagnétiques. C'est une des méthodes les plus couramment utilisées pour l'identification des molécules organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés vibrationnelles. Classiquement l'étude d'un échantillon est

E. Caractérisations spectroscopiques

réalisée entre 400 et 4000 cm^{-1} . On observe ainsi des bandes de transition pouvant correspondre à plusieurs modes de vibration. On a ainsi :

- les vibrations d'élongations (ν),
- les vibrations de déformation (δ).

Dans le cadre de ce travail de thèse, les nanoparticules mésoporeuses fonctionnalisées ont été caractérisées par spectroscopie infrarouge afin de mettre en évidence la présence des groupements organiques mais aussi la présence au sein du matériau, des différents types de silanols de surface. Pour ce faire, les spectres ont été réalisés dans différentes conditions expérimentales, à savoir, à l'air ambiant, sous vide à température ambiante ou après chauffage. Ces analyses ont demandé le dispositif expérimental présentés sur la Figure E-8.

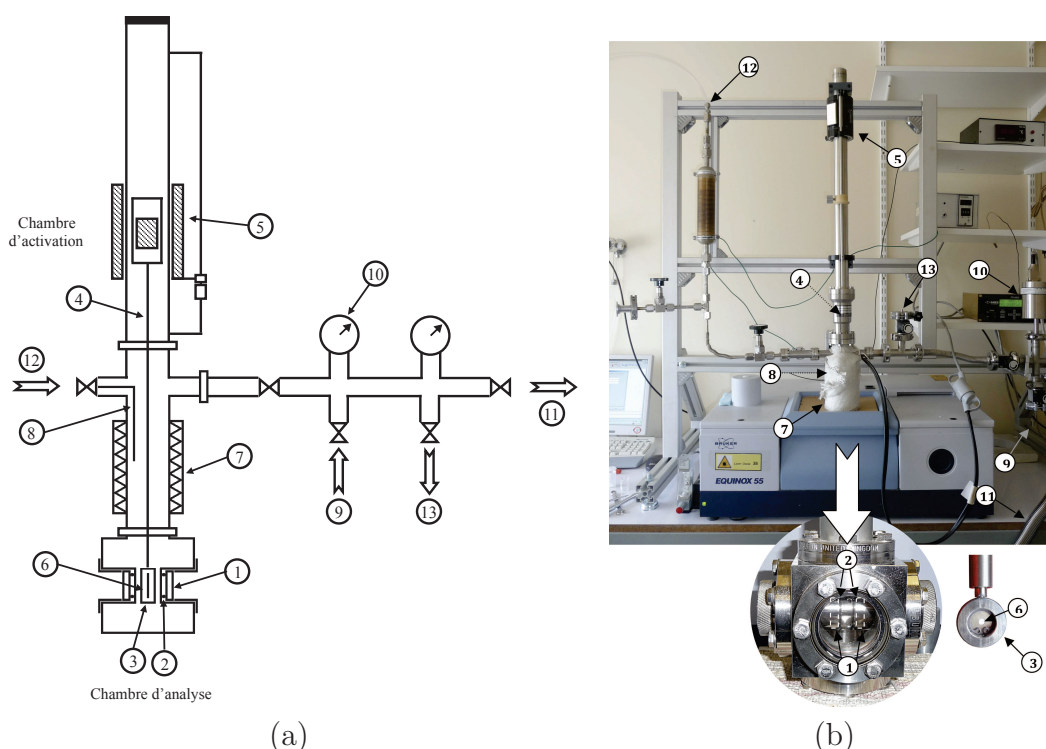


FIGURE E-8 : Schéma (a) et photographies (b) du dispositif expérimental de mesure par spectroscopie infrarouge. 1) fenêtre en KBr, 2) joint en indium, 3) porte-échantillon, 4) tige mobile, 5) manipulateur magnétique, 6) échantillon sous forme de pastille, 7) four, 8) thermocouple, 9) entrée du gaz, 10) capteur de pression, 11) ligne de vide, 12) flux d'azote, 13) vanne d'évacuation. D'après [438].

Le coeur de la chambre d'analyse est construit à partir d'un cube ultravide à six voies (Nor-Cal) en inox. Deux des faces opposées sont scellées par des fenêtres en KBr maintenues à l'aide de joints en indium et de bagues de serrage. Les deux autres situées en vis-à-vis sont obturées par des hublots en Pyrex[®] qui permettent la visualisation du porte échantillon. La cinquième face est fermée à l'aide d'une bride pleine. Enfin, la sixième est reliée à une croix de réduction (Caburn) de 38 mm de diamètre, de 250 mm de longueur et de 140 mm de largeur. L'ensemble est relié à une canne de transfert magnétique qui permet de déplacer le porte échantillon de la chambre d'analyse à la chambre de traitement thermique. L'échantillon est disposé, dans le porte-échantillon entre deux pastilles de KBr compressées. Dans les conditions

de l'expérience, le réacteur est connecté : (i) à un flux d'azote afin d'activer l'échantillon dans une atmosphère inerte, (ii) à une ligne de vide constituée d'une pompe turbomoléculaire, (iii) à une source de fluide. L'étanchéité entre les différents éléments est assurée au moyen de joints métalliques en cuivre. La pression imposée dans l'enceinte (de 10^{-5} à 103 hPa) est contrôlée à l'aide de deux capteurs à membrane de type Baratron.

F Caractéristiques des instruments utilisés

Les caractéristiques des différents appareils utilisés dans ces travaux de thèse sont résumées dans le tableau suivant :

Technique	Appareil utilisé	Caractéristiques
AE ^a	Thermo [®] Electron Flash EA 1112 Series	Précision $\sim 1\%$ (m/m)
DDL et Zétamétrie	Malvern [®] Nano ZS	4 mW He-Ne ($\lambda = 633$ nm)
DRX	Bruker [®] D8 Advance Vantec linear PSD	K_{α} Cu, $\lambda = 1,5418$ Å
ICP-AES	AnalytikJena [®] ContrAA 700	Précision $\sim 5\%$ (m/m)
Lecteur de plaques	Biochrom [®] Asys UVM340	570 nm Logiciel : DigiRead
MEB	JEOL [®] JSM 7600F	Résolution 1,0 nm - 15 kV
MET	JEOL [®] JEM-2100 LaB ₆ /JEM-2100F (FEG)	Résolution 0,25/0,19 nm - 200 kV
Microscopie à confocal	Leica [®] TCS SP2	Objectif : $\times 63/1,4$
Sorption	Micromeritics [®] ASAP 2020	Molécule sonde : Azote
Spectroscopie IR à transformée de Fourier	Bruker [®] Equinox 55 Source Globalar	400 - 4000 cm^{-1}
Spectroscopie UV-Visible	UV-2550 Shimadzu [®]	175 - 1100 nm
Spectroscopie Raman	Renishaw [®] inVia microspectrometer	$\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm (Nd ³⁺ :YAG doublé) ou $\lambda_{\text{exc}} = 785$ nm (diode)
Spectroscopie RMN ²⁹ Si	Bruker [®] ASX 400	Logiciel : Topspin TM /DMfit
ATG	Discovery TA Instruments [®]	Précision 0,1% (m/m)

Rappel : ^aAE : Analyse Élémentaire.

G Valorisations des travaux de thèse

G.1 Publications

- *Mesoporous Silica Nanoparticles for Biomedical Applications : Size, Structure, and Colloidal Stability Control*, M. Varache, I. Bezverkhyy, F. Baras, F. Bouyer, **The Journal of Physical Chemistry C**, en cours de soumission

- *Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery System for Poorly Soluble Drugs*, M. Varache, F. Crevat, F. Bouyer, I. Bezverkhyy, F. Baras, F. Bouyer, en préparation

G.2 Communications orales

Le nom de la personne présentante est souligné.

- *Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery System for Poorly Soluble Drugs*, M. Varache, F. Crevat, Fl. Bouyer, I. Bezverkhyy, R. Chassagnon, N. Geoffroy, L. Saviot, F. Baras, F. Bouyer, **E-MRS 2013 Spring Meeting**, mai 2013, Strasbourg, France
- *Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery System for Poorly Soluble Drugs*, M. Varache, F. Crevat, Fl. Bouyer, I. Bezverkhyy, R. Chassagnon, N. Geoffroy, L. Saviot, F. Baras, F. Bouyer, **XIV^{èmes} journées des écoles doctorales Carnot et Louis Pasteur**, mai 2013, Dijon, France

G.3 Communications par affiches

Le nom de la personne présentante est souligné.

- *Nanoparticules d'oxydes métalliques à base de fer, de titane ou de silicium comme NANOMatériaux multifonctionnels pour applications BIOMédicales*, J. Boudon, J. Paris, M. Varache, F. Bouyer, G. Thomas, F. Demoisson et N. Millot, **Exposition CNRS « La vie en transparence »**, mai 2013, Dijon, France
- *Optimization of the structural and physiocochemical properties of mesoporous silica nanoparticles for biomedical applications*, M. Varache, I. Bezverkhyy, L. Saviot, F. Baras and F. Bouyer, **Hybrid Materials 2013**, mars 2013, Sorrento, Italie
- *Controlled release of cisplatin from functionalized mesoporous Silica Nanoparticles*, M. Varache, A. Royer, Fl. Bouyer, I. Bezverkhyy, L. Saviot, F. Baras and F. Bouyer, **Colloids and Nanomedicine 2012**, juillet 2012, Amsterdam, Pays-Bas
- *Elaboration of mesostructured silica nano-objects for the encapsulation of anticancer drug candidates*, M. Varache, Fl. Bouyer, L. Saviot, I. Bezverkhyy, F. Baras and F. Bouyer, **19^{ème} journées de l'AECCPCM**, avril 2012, Toulouse, France
- *Elaboration of mesostructured silica nano-objects for the encapsulation of anticancer drug candidates*, M. Varache, Fl. Bouyer, L. Saviot, I. Bezverkhyy, F. Baras and F. Bouyer, **8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology**, mars 2012, Istanbul, Turquie
- *Synthesis and characterization of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) for the encapsulation of anticancer drug*, M. Varache, A. Cot, I. Bezverkhyy, F. Baras and F. Bouyer, **Particles 2011**, Berlin, Allemagne
- *Encapsulation de dérivés du platine dans des nanoparticules mésoporeuses de silice (MSNs) en vue du ciblage de traitements de chimiothérapie anticancéreuse*, M. Varache, A. Cot,

F. Bouyer et F. Baras, **XII^{èmes} journées des écoles doctorales Carnot et Louis Pasteur**, mai 2011, Dijon, France

- *Inversion and characterization of photonic band gap crystals templates*, M. Varache, D. Carberry, A. Patil, D. Phillips and M. Miles, Workshop LMU, **International Doctorate Programm (IDK-NBT)**, juin 2010, Munich, Allemagne
- *Synthesis of silica nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs*, H. Ornek, Fl. Bouyer, J. Moretto, M. Varache, A.-H. Winter and F. Bouyer, **Particles 2010**, mai 2010, Orlando, Floride, USA

H Activités complémentaires

H.1 Encadrements scientifiques

- *Synthèse et adsorption de molécules sondes dans des nano- et microparticules de silice mésoporeuses en vue d'applications biomédicales*, Etienne Cierniak, **2012**, Projet de fin d'études de l'école d'ingénieur ESIREM
- *Synthèse de nanoparticules multifonctionnelles pour la délivrance contrôlée de substances actives*, Alexandre Royer, **2012**, Stage de Master 2 Nanotechnologies et Nanosciences/école ingénieur ESIREM
- *Synthèse et caractérisation de nanoparticules de silice par voie microémulsion pour des applications biomédicales*, Ulrich Legrand, **2012**, Stage de Master 1 Chimie Physique Nanosciences
- *Synthèse et fonctionnalisation de nanoparticules de silice à porosité structurale pour la délivrance de substances actives*, Amélie Cot, **2011**, Stage de Master 2 Nanotechnologies et Nanosciences
- *Synthèse de nanoparticules mésoporeuses de silice par voie sol-gel pour des applications pharmaceutiques*, Manuela Aoukar, **2010**, Projet de fin d'études de l'école d'ingénieur ESIREM
- *Elaboration de particules submicroniques de silice mésostructurée par broyage en vue d'applications pharmaceutiques*, Romane Sarrazin, **2010**, Projet de fin d'études de l'école d'ingénieur ESIREM

H.2 Enseignements

- 56 heures en 2012, 32 heures en 2011 et 2010 de TP de chimie générale pour les élèves de 2^{ème} année de licence de Physique-Chimie, Faculté de Sciences, Dijon
- 9 heures de TD et 9 heures de TP en 2011 de chimie-physique pour les élèves de 2^{ème} année de licence de Pharmacie, Faculté de Pharmacie, Dijon

H.3 Responsabilités administratives

- *Représentant Doctorants au Conseil et au Bureau du Département de Chimie de l'Université de Bourgogne de septembre 2011 à septembre 2013*
- *Membre élu du Conseil du Laboratoire ICB de mars 2012 à mars 2014*
- *Responsable communication du club jeune de la SCF, région Bourgogne - France Comté de octobre 2010 à avril 2013*

Bibliographie

- [1] F. Bray, J.-S. Ren, E. Masuyer, J. Ferlay, *International Journal of Cancer* **132**, 1133 (2013).
- [2] J. Ferlay, H. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D. Parkin, Cancer incidence and mortality worldwide, <http://globocan.iarc.fr> (2013).
- [3] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, G. Storm, *Journal of Controlled Release* **161**, 175 (2012).
- [4] K. J. Cho, X. Wang, S. M. Nie, Z. Chen, D. M. Shin, *Clinical Cancer Research* **14** (2008).
- [5] D. Neri, R. Bicknell, *Nature Reviews Cancer* **5**, 436 (2005).
- [6] V. R. Devadasu, V. Bhardwaj, M. N. V. R. Kumar, *Chemical Reviews* **113**, 1686 (2013).
- [7] V. Brabec, J. Kasparkova, *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **5**, 147 (2002).
- [8] C. Monneret, *Annales Pharmaceutiques Françaises* **69**, 286 (2011).
- [9] G. P. Stathopoulos, T. Boulikas, *Journal of Drug Delivery* **Volume 2012**, 10 pages (2012).
- [10] D. P. Nowotnik, E. Cvitkovic, *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 1214 (2009).
- [11] C. Barbé, J. Bartlett, L. Kong, K. Finnie, H. Lin, M. Larkin, S. Calleja, A. Bush, G. Calleja, *Advanced Materials* **16**, 1959 (2004).
- [12] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Small* **6**, 1952 (2010).
- [13] J. M. Rosenholm, A. Meinander, E. Peuhu, R. Niemi, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Lindén, *ACS Nano* **3**, 197 (2009).
- [14] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 7548 (2007).
- [15] J. Gu, S. Su, Y. Li, Q. He, J. Zhong, J. Shi, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **1**, 3446 (2010).
- [16] Y.-S. Lin, K. R. Hurley, C. L. Haynes, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **3**, 364 (2012).
- [17] B. G. Trewyn, S. Giri, I. I. Slowing, V. S. Y. Lin, *Chemical Communications* p. 3236 (2007).
- [18] J. Lu, M. Liong, J. Zink, F. Tamanoi, *Small* **3**, 1341 (2007).
- [19] L. Benoit, C. Duvillard, P. Rat, B. Chauffert, *Chirurgie* **124**, 375 (1999).
- [20] J. Moretto, B. Chauffert, F. Ghiringhelli, J. Aldrich-Wright, F. Bouyer, *Investigational New Drugs* **29**, 1164 (2011).

- [21] K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, J. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, *Pure and Applied Chemistry* **57**, 603 (1985).
- [22] G. J. d. A. A. Soler-Illia, C. Sanchez, B. Lebeau, J. Patarin, *Chemical Reviews* **102**, 4093 (2002).
- [23] A. Corma, *Journal of Catalysis* **216**, 298 (2003).
- [24] S. Sie, *Advanced Zeolite Science and Applications*, H. K. J.C. Jansen, M. Stöcker, J. Weitkamp, eds. (1994), vol. 85 of *Studies in Surface Science and Catalysis*, pp. 587 – 631.
- [25] M. Estermann, L. B. McCusker, C. Baerlocher, A. Merrouche, H. Kessler, *Nature* **352**, 320 (1991).
- [26] U. Ciesla, F. Schüth, *Microporous and Mesoporous Materials* **27**, 131 (1999).
- [27] A. Corma, *Chemical Reviews* **97**, 2373 (1997).
- [28] C. Vincent, E. R. Joseph, D. V. Clarence, *United States Patent Office* **19** (1971).
- [29] F. D. Renzo, H. Cambon, R. Dutartre, *Microporous Materials* **10**, 283 (1997).
- [30] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. W. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, *Journal of the American Chemical Society* **114**, 10834 (1992).
- [31] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **359**, 710 (1992).
- [32] J. S. Beck, *United States Patent* **50575296** (1991).
- [33] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petroff, F. Schuth, G. D. Stucky, *Nature* **368**, 317 (1994).
- [34] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, D. G. Demuth, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B. F. a. Chmelka, *Chemistry of Materials* **6**, 1176 (1994).
- [35] Q. Huo, D. I. Margolese, G. D. Stucky, *Chemistry of Materials* **8**, 1147 (1996).
- [36] P. T. Tanev, T. J. Pinnavaia, *Science* **267**, 865 (1995).
- [37] S. A. Bagshaw, T. J. Pinnavaia, *Angewandte Chemie International Edition in English* **35**, 1102 (1996).
- [38] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **279**, 548 (1998).
- [39] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Journal of the American Chemical Society* **120**, 6024 (1998).
- [40] J. L. Blin, A. Léonard, B. L. Su, *Chemistry of Materials* **13**, 3542 (2001).
- [41] J. R. Matos, M. Kruk, L. P. Mercuri, M. Jaroniec, L. Zhao, T. Kamiyama, O. Terasaki, T. J. Pinnavaia, Y. Liu, *Journal of the American Chemical Society* **125**, 821 (2003).
- [42] C. Yu, Y. Yu, D. Zhao, *Chemical Communications* pp. 575–576 (2000).
- [43] J. C. Jansen, Z. Shan, L. Marchese, W. Zhou, N. v. d. Puil, T. Maschmeyer, *Chemical Communications* pp. 713–714 (2001).
- [44] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2 : Molecular and Chemical Physics* **72**, 1525 (1976).

- [45] T. Kunitake, Y. Okahata, M. Shimomura, S. Yasunami, K. Takarabe, *Journal of the American Chemical Society* **103**, 5401 (1981).
- [46] N. K. Raman, M. T. Anderson, C. J. Brinker, *Chemistry of Materials* **8**, 1682 (1996).
- [47] C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, *Advanced Materials* **11**, 579 (1999).
- [48] C. J. Brinker, G. W. Scherer, *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing* (Academic Press, Inc., 1990).
- [49] J. Livage, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2**, 132 (1997).
- [50] C. Sanchez, *Elsevier* **13**, 1 (2009).
- [51] G. Bogush, C. Z. IV, *Journal of Colloid and Interface Science* **142**, 1 (1991).
- [52] T. Sugimoto, *Journal of Colloid and Interface Science* **309**, 106 (2007). Matijevic Festschrift.
- [53] R. K. Iler, *Journal of Colloid and Interface Science* **37**, 364 (1971).
- [54] N. Plumeré, A. Ruff, B. Speiser, V. Feldmann, H. A. Mayer, *Journal of Colloid and Interface Science* **368**, 208 (2012).
- [55] C. Tan, B. Bowen, N. Epstein, *Journal of Colloid and Interface Science* **118**, 290 (1987).
- [56] D. Green, S. Jayasundara, Y.-F. Lam, M. Harris, *Journal of Non-Crystalline Solids* **315**, 166 (2003).
- [57] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, *Journal of Colloid and Interface Science* **26** (1968).
- [58] A. V. Blaaderen, J. V. Geest, A. Vrij, *Journal of Colloid and Interface Science* **154**, 481 (1992).
- [59] G. V. Franks, *Journal of Colloid and Interface Science* **249**, 44 (2002).
- [60] L. Avadiar, Y.-K. Leong, *Colloid & Polymer Science* **289**, 237 (2011).
- [61] C. Boissière, M. A. U. Martines, M. Tokumoto, A. Larbot, E. Prouzet, *Chemistry of Materials* **15**, 509 (2003).
- [62] C. Brinker, G. Scherer, *Journal of Non-Crystalline Solids* **70**, 301 (1985).
- [63] C. Brinker, *Journal of Non-Crystalline Solids* **100**, 31 (1988).
- [64] A. Voegtlin, A. Matijasic, J. Patarin, C. Sauerland, Y. Grillet, L. Huve, *Microporous Materials* **10**, 137 (1997).
- [65] L. Pasqua, F. Testa, R. Aiello, F. D. Renzo, F. Fajula, *Microporous and Mesoporous Materials* **44-45**, 111 (2001).
- [66] F. D. Renzo, F. Testa, J. Chen, H. Cambon, A. Galarneau, D. Plee, F. Fajula, *Microporous and Mesoporous Materials* **28**, 437 (1999).
- [67] R. Aelion, A. Loebel, F. Eirich, *Journal of the American Chemical Society* **72**, 5705 (1950).
- [68] D. M. Antonelli, J. Y. Ying, *Angewandte Chemie International Edition in English* **35**, 426 (1996).
- [69] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Froeba, *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 3216 (2006).
- [70] J. C. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck, J. L. Schlenker, *Chemistry of Materials* **6**, 2317 (1994).

- [71] C.-Y. Chen, S. L. Burkett, H.-X. Li, M. E. Davis, *Microporous Materials* **2**, 27 (1993).
- [72] A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka, *Science* **261**, 1299 (1993).
- [73] G. D. Stucky, A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Margolese, D. Kumar, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka, *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A. Molecular Crystals and Liquid Crystals* **240**, 187 (1994).
- [74] A. Firouzi, D. Kumar, L. Bull, T. Besier, P. Sieger, Q. Huo, S. Walker, J. Zasadzinski, C. Glinka, J. Nicol, a. et, *Science* **267**, 1138 (1995).
- [75] J. Y. Ying, C. P. Mehnert, M. S. Wong, *Angewandte Chemie International Edition* **38**, 56 (1999).
- [76] R. Schmidt, M. Stöcker, E. Hansen, D. Akporiaye, O. H. Ellestad, *Microporous Materials* **3**, 443 (1995).
- [77] X. S. Zhao, G. Q. M. Lu, G. J. Millar, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **35**, 2075 (1996).
- [78] Y. Mori, T. J. Pinnavaia, *Chemistry of Materials* **13**, 2173 (2001).
- [79] C. Boissière, Elaboration de silices mésoporeuses MSU-X : applications en chromatographie HPLC et membranes d'ultrafiltration, Ph.D. thesis, Université de Montpellier II (2001).
- [80] M. Vallet-Regí, A. Rámila, R. P. del Real, J. Pérez-Pariente, *Chemistry of Materials* **13**, 308 (2001).
- [81] K. K. Unger, D. Kumar, M. Grün, G. Büchel, S. Lüdtke, T. Adam, K. Schumacher, S. Renker, *Journal of Chromatography A* **892**, 47 (2000).
- [82] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochem. J.* **377**, 159 (2004).
- [83] V. Valtchev, L. Tosheva, *Chemical Reviews* **113**, 6732 (2013).
- [84] A. van Blaaderen, A. Kentgens, *Journal of Non-Crystalline Solids* **149**, 161 (1992).
- [85] S. Kang, S. I. Hong, C. R. Choe, M. Park, S. Rim, J. Kim, *Polymer* **42**, 879 (2001).
- [86] G. Büchel, K. K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi, *Advanced Materials* **10**, 1036 (1998).
- [87] G. Büchel, M. Grün, K. K. Unger, A. Matsumoto, T. Kazuo, *Supramolecular Science* **5**, 253 (1998).
- [88] M. Grün, I. Lauer, K. K. Unger, *Advanced Materials* **9**, 254 (1997).
- [89] M. Grün, K. K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi, *Microporous and Mesoporous Materials* **27**, 207 (1999).
- [90] B. Pauwels, G. Van Tendeloo, C. Thoelen, W. Van Rhijn, P. A. Jacobs, *Advanced Materials* **13**, 1317 (2001).
- [91] C.-F. Cheng, D. Ho Park, J. Klinowski, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **93**, 193 (1997).
- [92] S. Liu, P. Cool, O. Collart, P. Van Der Voort, E. F. Vansant, O. I. Lebedev, G. Van Tendeloo, M. Jiang, *The Journal of Physical Chemistry B* **107**, 10405 (2003).

- [93] G. V. Tendeloo, O. I. Lebedev, O. Collart, P. Cool, E. F. Vansant, *Journal of Physics : Condensed Matter* **15**, S3037 (2003).
- [94] O. I. Lebedev, G. V. Tendeloo, O. Collart, P. Cool, E. F. Vansant, *Solid State Sciences* **6**, 489 (2004).
- [95] C. Mou, H. Lin, *Pure and Applied Chemistry* **72**, 137 (2000).
- [96] K. Yano, Y. Fukushima, *Journal of Materials Chemistry* **13**, 2577 (2003).
- [97] R. I. Nooney, D. Thirunavukkarasu, Y. Chen, R. Josephs, A. E. Ostafin, *Chemistry of Materials* **14**, 4721 (2002).
- [98] S. Liu, L. Lu, Z. Yang, P. Cool, E. F. Vansant, *Materials Chemistry and Physics* **97**, 203 (2006).
- [99] K. Schumacher, M. Grün, K. Unger, *Microporous and Mesoporous Materials* **27**, 201 (1999).
- [100] Q. Cai, Z.-S. Luo, W.-Q. Pang, Y.-W. Fan, X.-H. Chen, F.-Z. Cui, *Chemistry of Materials* **13**, 258 (2001).
- [101] H.-P. Lin, C.-Y. Mou, *Accounts of Chemical Research* **35**, 927 (2002).
- [102] M.-C. Chao, H.-P. Lin, C.-Y. Mou, *Chemistry Letters* **33**, 672 (2004).
- [103] B. Alonso, C. Clinard, D. Durand, E. Veron, D. Massiot, *Chemical Communications* pp. 1746–1748 (2005).
- [104] N. Baccile, D. Grosso, C. Sanchez, *Journal of Materials Chemistry* **13**, 3011 (2003).
- [105] M. T. Bore, S. B. Rathod, T. L. Ward, A. K. Datye, *Langmuir* **19**, 256 (2003).
- [106] C. E. Fowler, D. Khushalani, B. Lebeau, S. Mann, *Advanced Materials* **13**, 649 (2001).
- [107] S. Sadasivan, C. E. Fowler, D. Khushalani, S. Mann, *Angewandte Chemie International Edition* **41**, 2151 (2002).
- [108] C. L. Frye, G. A. Vincent, W. A. Finzel, *Journal of the American Chemical Society* **93**, 6805 (1971).
- [109] P. D. Raytchev, Nouvelles applications des proazaphosphatranes et molécules apparentées : Vers la catalyse en espace confiné et en milieu hétérogène, Ph.D. thesis, Ecole Normale Supérieure de Lyon (2011).
- [110] K. Möller, J. Kobler, T. Bein, *Advanced Functional Materials* **17**, 605 (2007).
- [111] L. Pan, Q. He, J. Liu, Y. Chen, M. Ma, L. Zhang, J. Shi, *Journal of the American Chemical Society* **134**, 5722 (2012).
- [112] M. J. Hollamby, D. Borisova, P. Brown, J. Eastoe, I. Grillo, D. Shchukin, *Langmuir* **28**, 4425 (2012).
- [113] H. Yamada, C. Urata, Y. Aoyama, S. Osada, Y. Yamauchi, K. Kuroda, *Chemistry of Materials* **24**, 1462 (2012).
- [114] K. Ma, H. Sai, U. Wiesner, *Journal of the American Chemical Society* **134**, 13180 (2012).
- [115] F. Lu, S. H. Wu, Y. Hung, C. Y. Mou, *Small* **5**, 1408 (2009).
- [116] Z.-A. Qiao, L. Zhang, M. Guo, Y. Liu, Q. Huo, *Chemistry of Materials* **21**, 3823 (2009).
- [117] R. Sabre, *Techniques de l'ingénieur Génie industriel alimentaire* (2013).

- [118] Y.-D. Chiang, H.-Y. Lian, S.-Y. Leo, S.-G. Wang, Y. Yamauchi, K. C.-W. Wu, *The Journal of Physical Chemistry C* **115**, 13158 (2011).
- [119] M. Yu, L. Zhou, J. Zhang, P. Yuan, P. Thorn, W. Gu, C. Yu, *Journal of Colloid and Interface Science* **376**, 67 (2012).
- [120] K. Suzuki, K. Ikari, H. Imai, *Journal of the American Chemical Society* **126**, 462 (2004).
- [121] Q. Chen, L. Han, C. Gao, S. Che, *Microporous and Mesoporous Materials* **128**, 203 (2010).
- [122] E. Alami, N. V. Os, L. Rupert, B. D. Jong, F. Kerkhof, R. Zana, *Journal of Colloid and Interface Science* **160**, 205 (1993).
- [123] T.-W. Kim, P.-W. Chung, V. S.-Y. Lin, *Chemistry of Materials* **22**, 5093 (2010).
- [124] C.-Y. Lai, B. G. Trewyn, D. M. Jeftinija, K. Jeftinija, S. Xu, S. Jeftinija, V. S.-Y. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **125**, 4451 (2003).
- [125] A. Berggren, A. E. C. Palmqvist, *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 732 (2008).
- [126] Q. He, X. Cui, F. Cui, L. Guo, J. Shi, *Microporous and Mesoporous Materials* **117**, 609 (2009).
- [127] C. Urata, Y. Aoyama, A. Tonegawa, Y. Yamauchi, K. Kuroda, *Chemical Communications* pp. 5094–5096 (2009).
- [128] T. Suteewong, H. Sai, R. Cohen, S. Wang, M. Bradbury, B. Baird, S. M. Gruner, U. Wiesner, *Journal of the American Chemical Society* **133**, 172 (2011).
- [129] Y.-S. Lin, N. Abadeer, C. L. Haynes, *Chemical Communications* **47**, 532 (2011).
- [130] C. Tourné-Péteilh, D. Brunel, S. Begu, B. Chiche, F. Fajula, D. A. Lerner, J.-M. Devoisselle, *New Journal of Chemistry New Journal of Chemistry New Journal Chemistry* **27**, 1415 (2003).
- [131] A. Datt, I. El-Maazawi, S. C. Larsen, *The Journal of Physical Chemistry C* **116**, 18358 (2012).
- [132] M. Thomas, I. Slipper, A. Walunj, A. Jain, M. Favretto, P. Kallinteri, D. Douroumis, *International Journal of Pharmaceutics* **387**, 272 (2010).
- [133] P. Horcajada, A. Rámila, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, *Microporous and Mesoporous Materials* **68**, 105 (2004).
- [134] I. Izquierdo-Barba, Á. Martínez, A. L. Doadrio, J. Pérez-Pariente, M. Vallet-Regí, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **26**, 365 (2005).
- [135] T. Azaïs, C. Tourné-Péteilh, F. Aussenac, N. Baccile, C. Coelho, J.-M. Devoisselle, F. Babonneau, *Chemistry of Materials* **18**, 6382 (2006).
- [136] V. Cauda, B. Onida, B. Platschek, L. Muhlstein, T. Bein, *Journal of Materials Chemistry* **18**, 5888 (2008).
- [137] P. Horcajada, A. Rámila, G. Férey, M. Vallet-Regí, *Solid State Sciences* **8**, 1243 (2006).
- [138] A. Nieto, M. Colilla, F. Balas, M. Vallet-Regí, *Langmuir* **26**, 5038 (2010).
- [139] C. Arean, M. Vesga, J. Parra, M. Delgado, *Ceramics International* **39**, 7407 (2013).
- [140] W. Xu, J. Riikonen, V.-P. Lehto, *International Journal of Pharmaceutics* **453**, 181 (2013).
- [141] Y. Zhang, Z. Zhi, T. Jiang, J. Zhang, Z. Wang, S. Wang, *Journal of Controlled Release*

- 145**, 257 (2010).
- [142] G. Wang, A. N. Otuonye, E. A. Blair, K. Denton, Z. Tao, T. Asefa, *Journal of Solid State Chemistry* **182**, 1649 (2009).
- [143] T. Linnell, H. A. Santos, E. Mäkilä, T. Heikkilä, J. Salonen, D. Y. Murzin, N. Kumar, T. Laaksonen, L. Peltonen, J. Hirvonen, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **100**, 3294 (2011).
- [144] C. Charnay, S. Bégu, C. Tourné-Péteilh, L. Nicole, D. Lerner, J. Devoisselle, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57**, 533 (2004).
- [145] R. Vathyam, E. Wondimu, S. Das, C. Zhang, S. Hayes, Z. Tao, T. Asefa, *The Journal of Physical Chemistry C* **115**, 13135 (2011).
- [146] F. Hoffmann, M. Froba, *Chemical Society Reviews* **40**, (2011).
- [147] D. Brunel, *Microporous and Mesoporous Materials* **27**, 329 (1999).
- [148] L. Zhuravlev, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **173**, 1 (2000).
- [149] B. Morrow, A. McFarlan, *Journal of Non-Crystalline Solids* **120**, 61 (1990).
- [150] P. M. Price, J. H. Clark, D. J. Macquarrie, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* pp. 101–110 (2000).
- [151] G. E. Maciel, D. W. Sindorf, *Journal of the American Chemical Society* **102**, 7606 (1980).
- [152] C.-Y. Chen, H.-X. Li, M. E. Davis, *Microporous Materials* **2**, 17 (1993).
- [153] B. A. Morrow, A. J. McFarlan, *The Journal of Physical Chemistry* **96**, 1395 (1992).
- [154] X. S. Zhao, G. Q. Lu, A. K. Whittaker, G. J. Millar, H. Y. Zhu, *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 6525 (1997).
- [155] I. Izquierdo-Barba, L. Ruiz-González, J. C. Doadrio, J. M. González-Calbet, M. Vallet-Regí, *Solid State Sciences* **7**, 983 (2005).
- [156] P. Van Der Voort, I. Gillis-D’Hamers, K. C. Vrancken, E. F. Vansant, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* **87**, 3899 (1991).
- [157] C. Brinker, R. Brow, D. Tallant, R. Kirkpatrick, *Journal of Non-Crystalline Solids* **120**, 26 (1990).
- [158] C. Brinker, R. Kirkpatrick, D. Tallant, B. Bunker, B. Montez, *Journal of Non-Crystalline Solids* **99**, 418 (1988).
- [159] A. Alessi, S. Agnello, G. Buscarino, F. Gelardi, *Journal of Non-Crystalline Solids* **362**, 20 (2013).
- [160] F. Galeener, *Solid State Communications* **44**, 1037 (1982).
- [161] R. Mueller, H. K. Kammler, K. Wegner, S. E. Pratsinis, *Langmuir* **19**, 160 (2003).
- [162] N. Igarashi, K. A. Koyano, Y. Tanaka, S. Nakata, K. Hashimoto, T. Tatsumi, *Microporous and Mesoporous Materials* **59**, 43 (2003).
- [163] C. G. Armistead, A. J. Tyler, F. H. Hambleton, S. A. Mitchell, J. A. Hockey, *The Journal of Physical Chemistry* **73**, 3947 (1969).
- [164] A. Barabanova, T. Pryakhina, E. Afanas’ev, B. Zavín, Y. Vygodskii, A. Askadskii, O. Phi-

- lippova, A. Khokhlov, *Applied Surface Science* **258**, 3168 (2012).
- [165] H. Gilman, L. S. Miller, *Journal of the American Chemical Society* **73**, 2367 (1951).
- [166] G. W. Sears, *Analytical Chemistry* **28**, 1981 (1956).
- [167] L. T. Zhuravlev, *Langmuir* **3**, 316 (1987).
- [168] S. de Monredon Senani, Interaction Organosilanes/silice de précipitation - Du milieu hydro-alcoolique au milieux aqueux, Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie (2004).
- [169] S. Calmettes, Conception d'un catalyseur par greffage d'un complexe de ruthénium en milieu confiné ; application à l'oxydation sélectivete, Ph.D. thesis, Ecole Normale Supérieure de Lyon (2008).
- [170] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Journal of Materials Chemistry* **20**, 7924 (2010).
- [171] U. Deschler, P. Kleinschmit, P. Panster, *Angewandte Chemie International Edition in English* **25**, 236 (1986).
- [172] E. J. Acosta, C. S. Carr, E. E. Simanek, D. F. Shantz, *Advanced Materials* **16**, 985 (2004).
- [173] F. de Juan, E. Ruiz-Hitzky, *Advanced Materials* **12**, 430 (2000).
- [174] M. H. Lim, A. Stein, *Chemistry of Materials* **11**, 3285 (1999).
- [175] K. Moller, T. Bein, *Chemistry of Materials* **10**, 2950 (1998).
- [176] A. Sayari, S. Hamoudi, *Chemistry of Materials* **13**, 3151 (2001).
- [177] D. Brunel, A. Cauvel, F. Fajula, F. DiRenzo, *Zeolites : a Refined Tool for Designing Catalytic Sites*, vol. 97 (1995).
- [178] D. Brunel, N. Bellocq, P. Sutra, A. Cauvel, M. Laspéras, P. Moreau, F. D. Renzo, A. Galarneau, F. Fajula, *Coordination Chemistry Reviews* **178 - 180, Part 2**, 1085 (1998).
- [179] D. Brunel, A. C. Blanc, A. Galarneau, F. Fajula, *Catalysis Today* **73**, 139 (2002).
- [180] A. Taguchi, F. Schüth, *Microporous and Mesoporous Materials* **77**, 1 (2005).
- [181] J. M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Linden, *Nanoscale* **2**, 1870 (2010).
- [182] S. L. Burkett, S. D. Sims, S. Mann, *Chemical Communications* pp. 1367–1368 (1996).
- [183] D. J. Macquarrie, *Chemical Communications* pp. 1961–1962 (1996).
- [184] M. H. Lim, C. F. Blanford, A. Stein, *Journal of the American Chemical Society* **119**, 4090 (1997).
- [185] C. E. Fowler, S. Mann, B. Lebeau, *Chemical Communications* pp. 1825–1826 (1998).
- [186] S. R. Hall, C. E. Fowler, S. Mann, B. Lebeau, *Chemical Communications* pp. 201–202 (1999).
- [187] D. R. Radu, C.-Y. Lai, J. Huang, X. Shu, V. S.-Y. Lin, *Chemical Communications* pp. 1264–1266 (2005).
- [188] L. Mercier, T. J. Pinnavaia, *Chemistry of Materials* **12**, 188 (2000).
- [189] A. Walcarius, C. Delacôte, *Chemistry of Materials* **15**, 4181 (2003).
- [190] V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Lindén, *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 689 (2013).
- [191] Z. Li, J. C. Barnes, A. Bosoy, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *Chemical Society Reviews* **41**,

- (2012).
- [192] J. L. Vivero-Escoto, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Mesoporous silica nanoparticles : synthesis and applications*, vol. 3 (Annual Review of Nano Research, 2010).
 - [193] S. Huh, J. W. Wiench, B. G. Trewyn, S. Song, M. Pruski, V. S.-Y. Lin, *Chemical Communications* pp. 2364–2365 (2003).
 - [194] D. A. Loy, K. J. Shea, *Chemical Reviews* **95**, 1431 (1995).
 - [195] K. J. Shea, D. A. Loy, *Chemistry of Materials* **13**, 3306 (2001).
 - [196] J.-L. Bridot, A.-C. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Josserand, J.-L. Coll, L. Vander Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat, O. Tillement, *Journal of the American Chemical Society* **129**, 5076 (2007).
 - [197] A. M. P. Dupraz, J. R. de Wijn, S. A. T. v.d. Meer, K. de Groot, *Journal of Biomedical Materials Research* **30**, 231 (1996).
 - [198] L. D. L. B. V. Derjaguin, *Acta Physicochimica U.R.S.S.* **14**, 633 (1941).
 - [199] J. G. O. E. J. W. Verwey, *Theory of the stability of lyophobic colloids* (Elsevier Publishing Company. Inc., 1948).
 - [200] J.-P. Jolivet, J. Livage, M. Henry, *De la solution à l'oxyde* (InterEditions/CNRS, 1944).
 - [201] R. J. Hunter, *Foundations of colloid science* (Oxford university press, 2001).
 - [202] A. Islam, B. Chowdhry, M. Snowden, *Advances in Colloid and Interface Science* **62**, 109 (1995).
 - [203] J. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces* (Academic Press, 1991).
 - [204] J. Trompette, M. Meireles, *Journal of Colloid and Interface Science* **263**, 522 (2003).
 - [205] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica. Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry* (John Wiley & Sons, Inc., 1979).
 - [206] M. Etienne, A. Walcarius, *Talanta* **59**, 1173 (2003).
 - [207] R. J. Hunter, *Zeta Potential In Colloid Science : Principles And Applications* (Academic Press, 1988).
 - [208] H. Yotsumoto, R.-H. Yoon, *Journal of Colloid and Interface Science* **157**, 434 (1993).
 - [209] R. P. Bagwe, L. R. Hilliard, W. Tan, *Langmuir* **22**, 4357 (2006).
 - [210] F. Gao, F. Luo, J. Yin, L. Wang, *Luminescence* **23**, 392 (2008).
 - [211] R. Kumar, I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, L. N. Goswami, A. C. Bonoiu, E. J. Bergey, K. M. Trampusch, A. Maitra, P. N. Prasad, *ACS Nano* **2**, 449 (2008).
 - [212] D.H. Napper, *Journal of Colloid and Interface Science* **32**, 106 (1970).
 - [213] P. de Gennes, *Advances in Colloid and Interface Science* **27**, 189 (1987).
 - [214] A. Mori, A. L. Klibanov, V. P. Torchilin, L. Huang, *FEBS Letters* **284**, 263 (1991).
 - [215] C. Yage, M. Moros, V. Graz, M. Arruebo, J. Santamaría, *Chemical Engineering Journal* **137**, 45 (2008). Porous Inorganic Materials for Biomedical Applications.
 - [216] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chemical Society Reviews* **41**, (2012).
 - [217] A. Kozlowski, J. M. Harris, *Journal of Controlled Release* **72**, 217 (2001).
 - [218] A. S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan, S. Seal, *Angew Chem Int Ed Engl* **50**, 1980 (2011).

- [219] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 6288 (2010).
- [220] C. Tassa, S. Y. Shaw, R. Weissleder, *Accounts of Chemical Research* **44**, 842 (2011).
- [221] E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Journal of Controlled Release* **130**, 98 (2008).
- [222] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. Müller, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **18**, 301 (2000).
- [223] V. Cauda, C. Argyo, T. Bein, *Journal of Materials Chemistry* **20**, 8693 (2010).
- [224] V. Cauda, A. Schlossbauer, T. Bein, *Microporous and Mesoporous Materials* **132**, 60 (2010).
- [225] Q. He, J. Zhang, J. Shi, Z. Zhu, L. Zhang, W. Bu, L. Guo, Y. Chen, *Biomaterials* **31**, 1085 (2010).
- [226] H. Meng, W. X. Mai, H. Zhang, M. Xue, T. Xia, S. Lin, X. Wang, Y. Zhao, Z. Ji, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **7**, 994 (2013).
- [227] D. Tarn, C. E. Ashley, M. Xue, E. C. Carnes, J. I. Zink, C. J. Brinker, *Accounts of Chemical Research* **46**, 792 (2013).
- [228] J. M. Rosenholm, E. Peuhu, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Lindén, *Nano Letters* **9**, 3308 (2009).
- [229] J. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Linden, *Journal of Materials Chemistry* **20**, 2707 (2010).
- [230] T. Xia, M. Kovichich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J. I. Zink, A. E. Nel, *ACS Nano* **3**, 3273 (2009).
- [231] D. L. Clemens, B.-Y. Lee, M. Xue, C. R. Thomas, H. Meng, D. Ferris, A. E. Nel, J. I. Zink, M. A. Horwitz, *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2535 (2012).
- [232] J. Folkman, D. M. Long, *Journal of Surgical Research* **4**, 139 (1964).
- [233] W. J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins, J. O'Shaughnessy, *Journal of Clinical Oncology* **23**, 7794 (2005).
- [234] P. Sabbatini, C. Aghajanian, D. Dizon, S. Anderson, J. Dupont, J. V. Brown, W. A. Peters, A. Jacobs, A. Mehdi, S. Rivkin, A. J. Eisenfeld, D. Spriggs, *Journal of Clinical Oncology* **22**, 4523 (2004).
- [235] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, *Clinical Cancer Research* **5**, 83 (1999).
- [236] H. Uchino, Y. Matsumura, T. Negishi, F. Koizumi, T. Hayashi, T. Honda, N. Nishiyama, K. Kataoka, S. Naito, T. Kakizoe, *British Journal of Cancer* **93**, 678 (2005).
- [237] E. Batrakova, T. Dorodnych, E. Klinskii, E. Kliushnenkova, O. Shemchukova, O. Goncharova, S. Arjakov, V. Alakhov, A. Kabanov, *British Journal of Cancer* **74**, 1545 (1996).
- [238] N. Malik, E. Evagorou, R. Duncan, *Anti-cancer drugs* **10**, 767 (1999).
- [239] T. Boulikas, *Expert Opinion on Investigational Drugs* **18**, 1197 (2009).
- [240] M. Markman, *Cancer Management and Research* **3**, 219 (2011).
- [241] M. R. Green, G. M. Manikhas, S. Orlov, B. Afanasyev, A. M. Makhson, P. Bhar, M. J.

- Hawkins, *Annals of Oncology* **17**, 1263 (2006).
- [242] J. Adler-Moore, R. T. Proffitt, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 21 (2002).
- [243] G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.-P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Chemical Communications* pp. 1182–1184 (2006).
- [244] M. E. Davis, Z. Chen, D. M. Shin, *Nature Reviews Drug Discovery* **7** (2008).
- [245] G. Orive, E. Anitua, J. L. Pedraz, D. F. Emerich, *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 682 (2009).
- [246] P. Carmeliet, R. K. Jain, *Nature* **407**, 249 (2000).
- [247] H. Maeda, *Advances in Enzyme Regulation* **41**, 189 (2001).
- [248] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *Journal of Controlled Release* **65**, 271 (2000).
- [249] N. T. Huynh, E. Roger, N. Lautram, J.-P. Benoît, C. Passirani, *Nanomedicine* **5**, 1415 (2010).
- [250] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 631 (2002).
- [251] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin, R. K. Jain, *Cancer Research* **55**, 3752 (1995).
- [252] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Research* **46**, 6387 (1986).
- [253] S. Jang, M. Wientjes, D. Lu, J.-S. Au, *Pharmaceutical Research* **20**, 1337 (2003).
- [254] S. Dhar, F. X. Gu, R. Langer, O. C. Farokhzad, S. J. Lippard, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 17356 (2008).
- [255] P. Hubert, *Bull Cancer* pp. 17 – 24 (2006).
- [256] R. Duncan, S. C. W. Richardson, *Molecular Pharmaceutics* **9**, 2380 (2012).
- [257] R. Duncan, *Nature Reviews Cancer* **6**, 688 (2006).
- [258] M. O. Oyewumi, R. A. Yokel, M. Jay, T. Coakley, R. J. Mumper, *Journal of Controlled Release* **95**, 613 (2004).
- [259] J. R. Lattin, W. G. Pitt, D. M. Belnap, G. A. Hussein, *Ultrasound in Medicine & Biology* **38**, 2163 (2012).
- [260] N. K. Mal, M. Fujiwara, Y. Tanaka, T. Taguchi, M. Matsukata, *Chemistry of Materials* **15**, 3385 (2003).
- [261] A. Baeza, E. Guisasola, E. Ruiz-Hernández, M. Vallet-Regi, *Chemistry of Materials* **24**, 517 (2012).
- [262] K. Engin, D. B. Leeper, J. R. Cater, A. J. Thistlethwaite, L. Tupchong, J. D. McFarlane, *International Journal of Hyperthermia* **11**, 211 (1995).
- [263] W. Gao, J. M. Chan, O. C. Farokhzad, *Molecular Pharmaceutics* **7**, 1913 (2010).
- [264] R. Liu, Y. Zhang, X. Zhao, A. Agarwal, L. J. Mueller, P. Feng, *Journal of the American Chemical Society* **132**, 1500 (2010).
- [265] B. Mark F. McCarty, M. Julian Whitaker, *Alternative Medicine Review* **15**, 264 (2010).
- [266] M. J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, S.-D. Li, *Journal of Controlled Release* **172**, 782 (2013).

- [267] D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos, *Pharmacological Reviews* **51**, 691 (1999).
- [268] H. Lee, H. Fonge, B. Hoang, R. M. Reilly, C. Allen, *Molecular Pharmaceutics* **7**, 1195 (2010).
- [269] B. Wang, X. He, Z. Zhang, Y. Zhao, W. Feng, *Accounts of Chemical Research* **46**, 761 (2013).
- [270] B. D. Chithrani, W. C. W. Chan, *Nano Letters* **7**, 1542 (2007).
- [271] K. Y. Win, S.-S. Feng, *Biomaterials* **26**, 2713 (2005).
- [272] K. Y. Choi, H. Y. Yoon, J.-H. Kim, S. M. Bae, R.-W. Park, Y. M. Kang, I.-S. Kim, I. C. Kwon, K. Choi, S. Y. Jeong, K. Kim, J. H. Park, *ACS Nano* **5**, 8591 (2011).
- [273] R.-L. Hong, C.-J. Huang, Y.-L. Tseng, V. F. Pang, S.-T. Chen, J.-J. Liu, F.-H. Chang, *Clinical Cancer Research* **5**, 3645 (1999).
- [274] A. Gabizon, D. Tzemach, J. Gorin, L. Mak, Y. Amitay, H. Shmeeda, S. Zalipsky, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **66**, 43 (2010).
- [275] R. Solomon, A. A. Gabizon, *Clinical Lymphoma and Myeloma* **8**, 21 (2008).
- [276] I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S.-Y. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **128**, 14792 (2006).
- [277] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Letters* **6**, 662 (2006).
- [278] B. G. Trewyn, J. A. Nieweg, Y. Zhao, V. S.-Y. Lin, *Chemical Engineering Journal* **137**, 23 (2008).
- [279] S. Giri, B. G. Trewyn, M. P. Stellmaker, V. S. Y. Lin, *Angewandte Chemie International Edition* **44**, 5038 (2005).
- [280] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, *Accounts of Chemical Research* **44**, 1029 (2011).
- [281] W. H. Tan, K. M. Wang, X. X. He, X. J. Zhao, T. Drake, L. Wang, R. P. Bagwe, *Medicinal Research Reviews* **24** (2004).
- [282] D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, *Journal of Materials Chemistry* **16**, 1013 (2006).
- [283] N. Lee, T. Hyeon, *Chemical Society Reviews* **41**, (2012).
- [284] R. Anselmann, *Journal of Nanoparticle Research* **3**, 329 (2001).
- [285] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, S. Giri, V. S. Y. Lin, *Advanced Functional Materials* **17**, 1225 (2007).
- [286] J. L. Vivero-Escoto, R. C. Huxford-Phillips, W. Lin, *Chemical Society Reviews* **41**, (2012).
- [287] A. Kunzmann, B. Andersson, T. Thurnherr, H. Krug, A. Scheynius, B. Fadeel, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1810**, 361 (2011).
- [288] X. Huang, L. Li, T. Liu, N. Hao, H. Liu, D. Chen, F. Tang, *ACS Nano* **5**, 5390 (2011).
- [289] T.-H. Chung, S.-H. Wu, M. Yao, C.-W. Lu, Y.-S. Lin, Y. Hung, C.-Y. Mou, Y.-C. Chen, D.-M. Huang, *Biomaterials* **28**, 2959 (2007).
- [290] S. Radin, G. El-Bassouini, E. J. Vresilovic, E. Schepers, P. Ducheyne, *Biomaterials* **26**, 1043 (2005).

- [291] S. P. Hudson, R. F. Padera, R. Langer, D. S. Kohane, *Biomaterials* **29**, 4045 (2008).
- [292] K. Finnie, D. Waller, F. Perret, A. Krause-Heuer, H. Lin, J. Hanna, C. Barbé, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **49**, 12 (2009).
- [293] I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty, P. N. Prasad, *Journal of the American Chemical Society* **125**, 7860 (2003).
- [294] T. Yu, K. Greish, L. D. McGill, A. Ray, H. Ghandehari, *ACS Nano* **6**, 2289 (2012).
- [295] S. Huh, J. W. Wiench, J.-C. Yoo, M. Pruski, V. S.-Y. Lin, *Chemistry of Materials* **15**, 4247 (2003).
- [296] A. B. Descalzo, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, K. Hoffmann, K. Rurack, *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 5924 (2006).
- [297] J. Kecht, A. Schlossbauer, T. Bein, *Chemistry of Materials* **20**, 7207 (2008).
- [298] A. S. M. Chong, X. S. Zhao, A. T. Kustedjo, S. Z. Qiao, *Microporous and Mesoporous Materials* **72**, 33 (2004).
- [299] B. G. Trewyn, I. I. Slowing, S. Giri, H.-T. Chen, V. S.-Y. Lin, *Accounts of Chemical Research* **40**, 846 (2007).
- [300] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, C.-W. Wu, V. S.-Y. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **131**, 3462 (2009).
- [301] T. Lebold, A. Schlossbauer, K. Schneider, L. Schermelleh, H. Leonhardt, T. Bein, C. Bräuchle, *Advanced Functional Materials* **22**, 106 (2012).
- [302] J. M. Rosenholm, E. Peuhu, L. T. Bate-Eya, J. E. Eriksson, C. Sahlgren, M. Lindén, *Small* **6**, 1234 (2010).
- [303] V. Cauda, H. Engelke, A. Sauer, D. Arcizet, C. Bräuchle, J. Rädler, T. Bein, *Nano Letters* **10**, 2484 (2010).
- [304] V. Brabec, J. Kasparkova, *Platinum-Based Drugs* (John Wiley & Sons, Inc. & Sons, Ltd, 2005), chap. 25, pp. 489–506.
- [305] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **205**, 698 (1965).
- [306] F. Muggia, *Gynecologic Oncology* **112**, 275 (2009).
- [307] B. Rosenberg, L. Vancamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **222**, 385 (1969).
- [308] L. Kelland, *Nat Rev Cancer* **7**, 573 (2007).
- [309] T. Esaki, S. Nakano, T. Tatsumoto, M. Kuroki-Migita, K. Mitsugi, M. Nakamura, Y. Niho, *Cancer Research* **52**, 6501 (1992).
- [310] L. J. Swinnen, D. M. Barnes, S. G. Fisher, K. S. Albain, R. I. Fisher, L. C. Erickson, *Cancer Research* **49**, 1383 (1989).
- [311] S. J. Lippard, *Pure and Applied Chemistry* **59**, 731 (1987).
- [312] C. M. Riley, L. A. Sternson, *Analytical Profiles of Drug Substances*, K. Florey, ed. (Academic Press, 1985), vol. 14, pp. 77 – 105.
- [313] S. J. Berners-Price, L. Ronconi, P. J. Sadler, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **49**, 65 (2006).
- [314] J. K.-C. Lau, B. Ensing, *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 10348 (2010).

- [315] J. Reedijk, *Chemical Communications* pp. 801–806 (1996).
- [316] M.-H. Baik, R. A. Friesner, S. J. Lippard, *Journal of the American Chemical Society* **125**, 14082 (2003).
- [317] F. Legendre, V. Bas, J. Kozelka, J. Chottard, *Chemistry, A European Journal* **6**, 2002 (2000).
- [318] J. Whittaker, V. Murray, W. D. McFadyen, G. Wickham, L. P. G. Wakelin, *Nucleic Acids Research* **26**, 3933 (1998).
- [319] D. Wang, S. J. Lippard, *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 307 (2005).
- [320] H. Huang, L. Zhu, B. Reid, G. Drobny, P. Hopkins, *Science* **270**, 1842 (1995).
- [321] Z. H. Siddik, *Oncogene* **22**, 7265 (2003).
- [322] R. P. Perez, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **34**, 1535 (1998).
- [323] F. İçli, H. Karaoğuz, D. Dinçol, A. Demirkazık, N. Günel, R. Karaoğuz, A. Üner, *Cancer* **72**, 587 (1993).
- [324] M. van den Bent, W. van Putten, P. Hilken, R. de Wit, M. van der Burg, *European Journal of Cancer* **38**, 387 (2002).
- [325] T. Ishikawa, F. Ali-Osman, *Journal of Biological Chemistry* **268**, 20116 (1993).
- [326] D. Gibson, *Dalton Trans.* pp. 10681–10689 (2009).
- [327] B. Stordal, M. Davey, *IUBMB Life* **59**, 696 (2007).
- [328] D. J. Stewart, *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **63**, 12 (2007).
- [329] A. Sharma, B. Mohanti, N. Lokeshwar, N. Shukla, S. Deo, V. Raina, *Indian Journal of Cancer* **43**, 16 (2006).
- [330] D. Lebwohl, R. Canetta, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **34**, 1522 (1998).
- [331] E. Raymond, S. G. Chaney, A. Taamma, E. Cvitkovic, *Annals of Oncology* **9**, 1053 (1998).
- [332] N. Uchida, Y. Takeda, K. Hojo, R. Maekawa, K. Sugita, T. Yoshioka, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **34**, 1796 (1998).
- [333] J. Reedijk, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 3611 (2003).
- [334] N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura, K. Kataoka, *Cancer Research* **63**, 8977 (2003).
- [335] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, A. Karydas, D. Ithakissios, *Journal of Controlled Release* **79**, 123 (2002).
- [336] K. N. J. Burger, R. W. H. M. Staffhorst, H. C. de Vrijlder, M. J. Velinova, P. H. Bomans, P. M. Frederik, B. de Kruijff, *Nature Medicine* **8**, 81 (2002).
- [337] M. J. Velinova, R. W. Staffhorst, W. J. Mulder, A. S. Dries, B. A. Jansen, B. de Kruijff, A. I. de Kroon, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1663**, 135 (2004).
- [338] Z. Tao, B. Toms, J. Goodisman, T. Asefa, *ACS Nano* **4**, 789 (2010).
- [339] K. Ajima, M. Yudasaka, A. Maigné, J. Miyawaki, S. Iijima, *The Journal of Physical Chemistry B* **110**, 5773 (2006).
- [340] K. J. Haxton, H. M. Burt, *Dalton Trans.* pp. 5872–5875 (2008).

- [341] P. Xu, E. A. Van Kirk, W. J. Murdoch, Y. Zhan, D. D. Isaak, M. Radosz, Y. Shen, *Biomacromolecules* **7**, 829 (2006).
- [342] J. Gu, J. Liu, Y. Li, W. Zhao, J. Shi, *Langmuir* **29**, 403 (2013).
- [343] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, V. S.-Y. Lin, *Biomaterials* **31**, 1325 (2010).
- [344] D. R. Radu, C.-Y. Lai, K. Jeftinija, E. W. Rowe, S. Jeftinija, V. S.-Y. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **126**, 13216 (2004).
- [345] C. Boissiere, A. Larbot, A. van der Lee, P. J. Kooyman, E. Prouzet, *Chemistry of Materials* **12**, 2902 (2000).
- [346] R. Ryoo, J. Kim, C. Ko, *Mesoporous Molecular Sieves 1998 Proceedings of the 1st International Symposium*, L. Bonneviot, F. Beland, C. Danumah, S. Giasson, S. Kaliaguine, eds. (Elsevier, 1998), vol. 117 of *Studies in Surface Science and Catalysis*, pp. 151 – 158.
- [347] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *Journal of the American Chemical Society* **60**, 309 (1938).
- [348] S. Storck, H. Bretinger, W. F. Maier, *Applied Catalysis A : General* **174**, 137 (1998).
- [349] IUPAC, *Pure and Applied Chemistry* **87**, 603 (1957).
- [350] L. Huerta, C. Guillem, J. Latorre, A. Beltrán, R. Martínez-Máñez, M. D. Marcos, D. Beltrán, P. Amorós, *Solid State Sciences* **8**, 940 (2006).
- [351] J. El Haskouri, D. Ortiz de Zárate, C. Guillem, A. Beltrán-Porter, M. Caldés, M. D. Marcos, D. Beltrán-Porter, J. Latorre, P. Amorós, *Chemistry of Materials* **14**, 4502 (2002).
- [352] E. Prouzet, T. J. Pinnavaia, *Angewandte Chemie International Edition in English* **36**, 516 (1997).
- [353] M. Kruk, M. Jaroniec, *Chemistry of Materials* **13**, 3169 (2001).
- [354] R. Viitala, M. Jokinen, S. L. Maunu, H. Jalonen, J. B. Rosenholm, *Journal of Non-Crystalline Solids* **351**, 3225 (2005).
- [355] R. Ryoo, J. M. Kim, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* pp. 711–712 (1995).
- [356] L. Chen, T. Horiuchi, T. Mori, K. Maeda, *The Journal of Physical Chemistry B* **103**, 1216 (1999).
- [357] D. Massiot, F. Fayon, M. Capron, I. King, S. Le Calvé, B. Alonso, J.-O. Durand, B. Bujoli, Z. Gan, G. Hoatson, *Magnetic Resonance in Chemistry* **40**, 70 (2002).
- [358] M. T. J. Keene, R. D. M. Gougeon, R. Denoyel, R. K. Harris, J. Rouquerol, P. L. Llewellyn, *Journal of Materials Chemistry* **9**, 2843 (1999).
- [359] G. Bogush, M. Tracy, C. Z. IV, *Journal of Non-Crystalline Solids* **104**, 95 (1988).
- [360] D. Nagao, H. Osuzu, A. Yamada, E. Mine, Y. Kobayashi, M. Konno, *Journal of Colloid and Interface Science* **279**, 143 (2004).
- [361] D. Green, J. Lin, Y.-F. Lam, M.-C. Hu, D. W. Schaefer, M. Harris, *Journal of Colloid and Interface Science* **266**, 346 (2003).
- [362] C. L. Chang, H. S. Fogler, *Langmuir* **13** (1997).
- [363] S. Che, Y. Sakamoto, O. Terasaki, T. Tatsumi, *Microporous and Mesoporous Materials*

- 85, 207 (2005).
- [364] Q. Chen, Y. Sakamoto, O. Terasaki, S. Che, *Microporous and Mesoporous Materials* **105**, 24 (2007).
- [365] B. Boote, H. Subramanian, K. T. Ranjit, *Chemical Communications* pp. 4543–4545 (2007).
- [366] F. Kleitz, W. Schmidt, F. Schüth, *Microporous and Mesoporous Materials* **65**, 1 (2003).
- [367] B. Tian, X. Liu, C. Yu, F. Gao, Q. Luo, S. Xie, B. Tu, D. Zhao, *Chemical Communications* pp. 1186–1187 (2002).
- [368] L. Chen, Z. Ping, G. Chuah, S. Jaenicke, G. Simon, *Microporous and Mesoporous Materials* **27**, 231 (1999).
- [369] S. Hitz, R. Prins, *Journal of Catalysis* **168**, 194 (1997).
- [370] S. C. Shen, S. Kawi, *Langmuir* **18**, 4720 (2002).
- [371] K. W. Gallis, C. C. Landry, *Advanced Materials* **13**, 23 (2001).
- [372] S. Jabariyan, M. A. Zanjanchi, *Ultrasonics Sonochemistry* **19**, 1087 (2012).
- [373] V. Cauda, C. Argyo, D. G. Piercey, T. Bein, *Journal of the American Chemical Society* **133**, 6484 (2011).
- [374] S. A. Bagshaw, I. J. Bruce, *Microporous and Mesoporous Materials* **109**, 199 (2008).
- [375] V. Lebrete, L. Raehm, J.-O. Durand, M. Smaïhi, C. Gérardin, N. Nerambourg, M. H. V. Werts, M. Blanchard-Desce, *Chemistry of Materials* **20**, 2174 (2008).
- [376] K. M. L. Taylor, J. S. Kim, W. J. Rieter, H. An, W. Lin, W. Lin, *Journal of the American Chemical Society* **130**, 2154 (2008).
- [377] V. Cauda, A. Schlossbauer, J. Kecht, A. Zürner, T. Bein, *Journal of the American Chemical Society* **131**, 11361 (2009).
- [378] N. Lang, A. Tuel, *Chemistry of Materials* **16**, 1961 (2004).
- [379] K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *The Journal of Physical Chemistry* **80**, 1462 (1976).
- [380] K. J. Chao, C. N. Wu, H. Chang, L. J. Lee, S.-f. Hu, *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 6341 (1997).
- [381] J. Gnado, P. Dhamelinourt, C. Pélégri, M. Traisnel, A. L. M. Mayot, *Journal of Non-Crystalline Solids* **208**, 247 (1996).
- [382] P. Knops-Gerrits, M. Cuyper, *Scientific Bases for the Preparation of Heterogeneous Catalysts Proceedings of the 8th International Symposium*, E. Gaigneaux, D. D. Vos, P. Grange, P. Jacobs, J. Martens, P. Ruiz, G. Poncelet, eds. (Elsevier, 2000), vol. 143 of *Studies in Surface Science and Catalysis*, pp. 705 – 714.
- [383] Y. Numata, Y. Iida, H. Tanaka, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **112**, 1043 (2011).
- [384] E. Spinner, *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **59**, 1441 (2003).
- [385] M. Landau, S. Varkey, M. Herskowitz, O. Regev, S. Pevzner, T. Sen, Z. Luz, *Microporous and Mesoporous Materials* **33**, 149 (1999).
- [386] T. Tatsumi, K. A. Koyano, Y. Tanaka, S. Nakata, *Chemistry Letters* **26**, 469 (1997).

- [387] M. Dietzel, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**, 3275 (2000).
- [388] P. Borm, F. C. Klaessig, T. D. Landry, B. Moudgil, J. Pauluhn, K. Thomas, R. Trottier, S. Wood, *Toxicological Sciences* **90**, 23 (2006).
- [389] M. S. Lord, B. G. Cousins, P. J. Doherty, J. M. Whitelock, A. Simmons, R. L. Williams, B. K. Milthorpe, *Biomaterials* **27**, 4856 (2006).
- [390] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *Journal of Colloid and Interface Science* **289**, 26 (2005).
- [391] S. V. Patwardhan, G. E. Tilburey, C. C. Perry, *Langmuir* **27**, 15135 (2011).
- [392] H. Ehrlich, K. D. Demadis, O. S. Pokrovsky, P. G. Koutsoukos, *Chemical Reviews* **110**, 4656 (2010).
- [393] D. T. On, S. Zaidi, S. Kaliaguine, *Microporous and Mesoporous Materials* **22**, 211 (1998).
- [394] S. Sayen, Réactivité de nouveaux matériaux hybrides organo-minéraux à base de silices en solution aqueuse : applications électrochimiques, Ph.D. thesis, Thèse de l'Université H. Pincaré, Nancy I (2003).
- [395] X. S. Zhao, F. Audsley, G. Q. Lu, *The Journal of Physical Chemistry B* **102**, 4143 (1998).
- [396] M. Broyer, S. Valange, J. P. Bellat, O. Bertrand, G. Weber, Z. Gabelica, *Langmuir* **18**, 5083 (2002).
- [397] F. Franks, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **45**, 221 (1998).
- [398] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 1688 (2006).
- [399] C. M. Graf, Q. Gao, I. Schütz, C. N. Noufele, W. Ruan, U. Posselt, E. Korotianskiy, D. Nordmeyer, F. Rancan, S. Hadam, A. Vogt, J. Lademann, V. Haucke, E. Ruehl, *Langmuir* **28**, 7598 (2012).
- [400] Q. Ye, Q. Xu, Y. Yu, R. Qu, Z. Fang, *Optics Communications* **282**, 3785 (2009).
- [401] L. S. Mendes, F. C. Oliveira, P. A. Suarez, J. C. Rubim, *Analytica Chimica Acta* **493**, 219 (2003).
- [402] B. G. Oliver, A. R. Davis, *Canadian Journal of Chemistry* **51**, 698 (1973).
- [403] I. Martinez, C. Sanchez-Valle, I. Daniel, B. Reynard, *Chemical Geology* **207**, 47 (2004).
- [404] Q. Sun, C. Qin, *Chemical Geology* **283**, 274 (2011).
- [405] J. D. Frantz, *Chemical Geology* **152**, 211 (1998).
- [406] S. El-Sheikh, S. El-Sherbiny, A. Barhoum, Y. Deng, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **422**, 44 (2013).
- [407] Y. Du, X. Lan, S. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, W. Zhang, F.-S. Xiao, *Microporous and Mesoporous Materials* **112**, 225 (2008).
- [408] G. Lelong, S. Bhattacharyya, S. Kline, T. Cacciaguerra, M. A. Gonzalez, M.-L. Saboungi, *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 10674 (2008).
- [409] H. Zhang, J. Wu, L. Zhou, D. Zhang, L. Qi, *Langmuir* **23**, 1107 (2007).
- [410] X. Du, J. He, *Dalton Trans.* **39**, 9063 (2010).
- [411] M. M. L. Ribeiro Carrott, A. J. Estêvão Candeias, P. J. M. Carrott, K. K. Unger, *Langmuir*

- 15**, 8895 (1999).
- [412] K. J. Edler, J. W. White, *Chemistry of Materials* **9**, 1226 (1997).
- [413] H.-P. Lin, C.-Y. Mou, *Microporous and Mesoporous Materials* **55**, 69 (2002).
- [414] R. Ryoo, S. Jun, *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 317 (1997).
- [415] W. Lin, Q. Cai, W. Pang, Y. Yue, B. Zou, *Microporous and Mesoporous Materials* **33**, 187 (1999).
- [416] N. Coustel, F. Di Renzo, F. Fajula, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* pp. 967–968 (1994).
- [417] A. Sayari, P. Liu, M. Kruk, M. Jaroniec, *Chemistry of Materials* **9**, 2499 (1997).
- [418] K. A. Koyano, T. Tatsumi, Y. Tanaka, S. Nakata, *The Journal of Physical Chemistry B* **101**, 9436 (1997).
- [419] A. Walcarius, M. Etienne, B. Lebeau, *Chemistry of Materials* **15**, 2161 (2003).
- [420] M. Etienne, Approches analytique et électrochimique du comportement en solution de silices mésoporeuses organiquement modifiées, Ph.D. thesis, Thèse de l'Université H. Poincaré, Nancy I (2001).
- [421] B. Isomaa, J. Reuter, B. M. Djupsund, *Archives of Toxicology* **35**, 91 (1976).
- [422] J. Kobler, K. Möller, T. Bein, *ACS Nano* **2**, 791 (2008).
- [423] S. Sadasivan, D. Khushalani, S. Mann, *Journal of Materials Chemistry* **13**, 1023 (2003).
- [424] H. Gu, Y. Guo, S. Y. Wong, Z. Zhang, X. Ni, Z. Zhang, W. Hou, C. He, V. Shim, X. Li, *Microporous and Mesoporous Materials* **170**, 226 (2013).
- [425] M. Chadwick, J. Goodwin, E. Lawson, P. Mills, B. Vincent, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **203**, 229 (2002).
- [426] N. Moitra, P. Trens, L. Raehm, J.-O. Durand, X. Cattoen, M. W. Chi Man, *Journal of Materials Chemistry* **21**, 13476 (2011).
- [427] S. Mornet, J. Portier, E. Duguet, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **293**, 127 (2005).
- [428] C. H. Lee, S. H. Park, W. Chung, J. Y. Kim, S. H. Kim, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **384**, 318 (2011).
- [429] M.-L. Chen, J. Zhang, Z. Zhang, B.-F. Yuan, Q.-W. Yu, Y.-Q. Feng, *Journal of Chromatography A* **1284**, 118 (2013).
- [430] Y. Zhang, Q. Xu, S. Zhang, J. Liu, J. Zhou, H. Xu, H. Xiao, J. Li, *Separation and Purification Technology* **116**, 391 (2013).
- [431] S. Singh, K. Barick, D. Bahadur, *Journal of Hazardous Materials* **192**, 1539 (2011).
- [432] K. Möller, J. Kobler, T. Bein, *Journal of Materials Chemistry* **17**, 624 (2007).
- [433] C. P. Tripp, M. L. Hair, *Langmuir* **8**, 1120 (1992).
- [434] P. J. E. Harlick, A. Sayari, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **46**, 446 (2007).
- [435] I. Díaz, C. Márquez-Alvarez, F. Mohino, J. Pérez-Pariente, E. Sastre, *Journal of Catalysis* **193**, 283 (2000).
- [436] R. A. Khatrri, S. S. C. Chuang, Y. Soong, M. Gray, *Energy & Fuels* **20**, 1514 (2006).

- [437] T. Yokoi, Y. Kubota, T. Tatsumi, *Applied Catalysis A : General* **421-422**, 14 (2012).
- [438] A. Ballandras, Apport et limitation de la spectroscopie infrarouge à la compréhension du phénomène de physisorption sur les zéolithes de topologie MFI, Ph.D. thesis, Ecole doctorale Carnot (2011).
- [439] T. Belin, N. Millot, F. Villieras, O. Bertrand, J. P. Bellat, *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 5333 (2004).
- [440] L. Huang, X. Chen, Q. Li, *Journal of Materials Chemistry* **11**, 610 (2001).
- [441] H. Okabayashi, I. Shimizu, E. Nishio, C. Connor, *Colloid and Polymer Science* **275**, 744 (1997).
- [442] N. Hiyoshi, K. Yogo, T. Yashima, *Microporous and Mesoporous Materials* **84**, 357 (2005).
- [443] I. Izquierdo-Barba, M. Colilla, M. Manzano, M. Vallet-Regí, *Microporous and Mesoporous Materials* **132**, 442 (2010).
- [444] A. Szegedi, M. Popova, I. Goshev, J. Mihály, *Journal of Solid State Chemistry* **184**, 1201 (2011).
- [445] X. Wang, J. C. Chan, Y.-H. Tseng, S. Cheng, *Microporous and Mesoporous Materials* **95**, 57 (2006).
- [446] J. B. Rosenholm, P. Stenius, I. Danielsson, *Journal of Colloid and Interface Science* **57**, 551 (1976).
- [447] L. White, C. Tripp, *Journal of Colloid and Interface Science* **232**, 400 (2000).
- [448] F. J. Boerio, L. H. Schoenlein, J. E. Greivenkamp, *Journal of Applied Polymer Science* **22**, 203 (1978).
- [449] B. Zhmud, J. Sonnefeld, *Journal of Non-Crystalline Solids* **195**, 16 (1996).
- [450] S. Bhattacharyya, H. Wang, P. Ducheyne, *Acta Biomaterialia* **8**, 3429 (2012).
- [451] L. Yang, F. Zhang, T. Endo, T. Hirotsu, *Macromolecules* **36**, 4709 (2003).
- [452] M. D. Popova, Á. Szegedi, I. N. Kolev, J. Mihály, B. S. Tzankov, G. T. Momekov, N. G. Lambov, K. P. Yoncheva, *International Journal of Pharmaceutics* **436**, 778 (2012).
- [453] N. H. Khadary, A. G. Howard, *Analyst* **136**, 3004 (2011).
- [454] Y. Takeda, Y. Komori, H. Yoshitake, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **422**, 68 (2013).
- [455] Y.-S. Li, N. E. Vecchio, *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **67**, 1321 (2007).
- [456] K.-L. Wong, M. E. Roz, L. Tosheva, J.-M. Goupil, S. Mintova, *Catalysis Today* **204**, 66 (2013).
- [457] Y.-S. Li, Y. Wang, T. Tran, A. Perkins, *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **61**, 3032 (2005).
- [458] H. Okabayashi, K. Izawa, T. Yamamoto, H. Masuda, E. Nishio, C. J. O'Connor, *Colloid and Polymer Science* **280**, 135 (2002).
- [459] A.-L. Papa, Synthèse et caractérisations de nanotubes d'oxydes de titane. fonctionnalisations en vue de leur application comme nouveaux nanovecteurs biologiques : cas de la

- transfection d'ADN dans les cardiomyocytes, Ph.D. thesis, Ecole doctorale Carnot (2009).
- [460] C. Scherdel, G. Reichenauer, M. Wiener, *Microporous and Mesoporous Materials* **132**, 572 (2010).
- [461] M. Manzano, V. Aina, C. Areán, F. Balas, V. Cauda, M. Colilla, M. Delgado, M. Vallet-Regí, *Chemical Engineering Journal* **137**, 30 (2008).
- [462] N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjugate Chemistry* **6**, 123 (1995).
- [463] H. Hinterwirth, W. Lindner, M. Lämmerhofer, *Analytica Chimica Acta* **733**, 90 (2012).
- [464] D. Bartczak, A. G. Kanaras, *Langmuir* **27**, 10119 (2011).
- [465] C. Zhao, Y.-L. Sun, R. L. Kirk, A. R. Thoreson, G. D. Jay, S. L. Moran, K.-N. An, P. C. Amadio, *The Journal of Bone & Joint Surgery* **92**, 1453 (2010).
- [466] N. T. Thanh, L. A. Green, *Nano Today* **5**, 213 (2010).
- [467] B. Thierry, L. Zimmer, S. McNiven, K. Finnie, C. Barbé, H. J. Griesser, *Langmuir* **24**, 8143 (2008).
- [468] F. Neville, T. Murphy, E. J. Wanless, *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects* **431**, 42 (2013).
- [469] J. Wang, H. Chen, H. Zhou, X. Liu, W. Qiao, D. Long, L. Ling, *Journal of Environmental Sciences* **25**, 124 (2013).
- [470] H. Kassab, M. Maksoud, S. Aguado, M. Pera-Titus, B. Albela, L. Bonneviot, *RSC Advances* **2**, 2508 (2012).
- [471] L. Feng, Y. Wang, N. Wang, Y. Ma, *Polymer Bulletin* **63**, 313 (2009).
- [472] F. Cuoq, A. Masion, J. Labille, J. Rose, F. Ziarelli, B. Prelot, J.-Y. Bottero, *Applied Surface Science* **266**, 155 (2013).
- [473] T. Hayashi, S. Mukamel, *Journal of Molecular Liquids* **141**, 149 (2008).
- [474] Y. Dong, R. Wang, H. Li, J. Shao, Y. Chi, X. Lin, G. Chen, *Carbon* **50**, 2810 (2012).
- [475] F. Gong, X. Cheng, S. Wang, Y. Wang, Y. Gao, S. Cheng, *Polymer* **50**, 2775 (2009).
- [476] A. Hirao, M. Hayashi, S. Loykulnant, K. Sugiyama, S. W. Ryu, N. Haraguchi, A. Matsuo, T. Higashihara, *Progress in Polymer Science* **30**, 111 (2005).
- [477] M. A. Quadir, R. Haag, *Journal of Controlled Release* **161**, 484 (2012).
- [478] T. Ohishi, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **32**, 281 (2004).
- [479] H. Shi, X. He, K. Wang, Y. Yuan, K. Deng, J. Chen, W. Tan, *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine* **3**, 266 (2007).
- [480] B. Steitz, J. Salaklang, A. Finka, C. O'Neil, H. Hofmann, A. Petri-Fink, *Bioconjugate Chemistry* **18**, 1684 (2007).
- [481] A. Chervin-Pétinot, M. Courçon, S. Almagro, A. Nicolas, A. Grichine, D. Grunwald, M.-H. Prandini, P. Huber, D. Gulino-Debrac, *Journal of Biological Chemistry* **287**, 7556 (2012).
- [482] J. A. Kim, C. Aberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nature Nanotechnology* **7**, 62 (2012).
- [483] Z. Tao, B. B. Toms, J. Goodisman, T. Asefa, *Chemical Research in Toxicology* **22**, 1869 (2009).
- [484] X. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Tang, J. He, *Biomaterials* **31**, 438 (2010).

- [485] M. Fisichella, H. Dabboue, S. Bhattacharyya, G. Lelong, M.-L. Saboungi, F. Warmont, P. Midoux, C. Pichon, M. Guerin, T. Hevor, J.-P. Salvétat, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **10**, 2314 (2010).
- [486] M. E. Bosch, A. R. Sánchez, F. S. Rojas, C. B. Ojeda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **47**, 451 (2008).
- [487] S. Hann, G. Koellensperger, Z. Stefanka, G. Stingeder, M. Furhacker, W. Buchberger, R. M. Mader, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **18**, 1391 (2003).
- [488] Z. Tao, Y. Xie, J. Goodisman, T. Asefa, *Langmuir* **26**, 8914 (2010).
- [489] K. Inagaki, S. Yonehara, Y. Kidani, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **33**, 3369 (1985).
- [490] E. D. Golla, G. H. Ayres, *Talanta* **20**, 199 (1973).
- [491] B. Anilanmert, G. Yalçin, F. Ariöz, E. Dölen, *Analytical Letters* **34**, 113 (2001).
- [492] F. Crevat, Synthèse de nanoparticules de silice mésoporeuse et contrôle de la cinétique de relargage d'un anticancéreux, Master's thesis, Université de Bourgogne (2013).
- [493] Y. Xia, Y. Wang, Y. Wang, C. Tu, F. Qiu, L. Zhu, Y. Su, D. Yan, B. Zhu, X. Zhu, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **88**, 674 (2011).
- [494] S. Fireman-Shoresh, N. Hüsing, D. Avnir, *Langmuir* **17**, 5958 (2001).
- [495] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chemical Reviews* **105**, 1103 (2005).
- [496] J. C. Dabrowiak, J. Goodisman, A.-K. Souid, *Drug Metabolism and Disposition* **30**, 1378 (2002).
- [497] L. Pendyala, P. Creaven, R. Perez, J. Zdanowicz, D. Raghavan, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **36**, 271 (1995).
- [498] S. J. Fischer, L. M. Benson, A. Fauq, S. Naylor, A. J. Windebank, *NeuroToxicology* **29**, 444 (2008).
- [499] A. M. Amado, S. M. Fiuza, M. P. M. Marques, L. A. E. B. de Carvalho, *The Journal of Chemical Physics* **127**, 185104 (2007).
- [500] B. Xu, I.-S. Park, Y. Li, D.-J. Chen, Y. J. Tong, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **662**, 52 (2011).
- [501] P. G. Lustemberg, C. Vericat, G. A. Benitez, M. E. Vela, N. Tognalli, A. Fainstein, M. L. Martiarena, R. C. Salvarezza, *The Journal of Physical Chemistry C* **112**, 11394 (2008).
- [502] H. Poulet, P. Delorme, J. Mathieu, *Spectrochimica Acta* **20**, 1855 (1964).
- [503] A. Szegedi, M. Popova, I. Goshev, S. Klébert, J. Mihály, *Journal of Solid State Chemistry* **194**, 257 (2012).
- [504] F. Rouquerol, *Techniques de l'ingénieur* (2003).
- [505] F. Rouquerol, J. Rouquerol, K. Sing, *Adsorption by powders and porous solids - Principle, methodology and applications* (San Diego : Academic Press, 1999).
- [506] P. H. Emmett, S. Brunauer, *Journal of the American Chemical Society* **59**, 1553 (1937).
- [507] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *Journal of the American Chemical Society* **73**, 373 (1951).

- [508] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **183**, 1802 (1959).
- [509] I. McDonald, *Physica* **51**, 273 (1971).
- [510] T. Benamor, Synthèse et caractérisation de silice mésoporeuses hydrophobes à porosité contrôlée, Ph.D. thesis, Ecole doctorale Jean Henri Lambert (2011).

Table des figures

1	<i>Représentation d'un vecteur à base de silice stabilisé par des polymères, couplé à une molécule fluorescente, fonctionnalisé par des molécules organiques et « encapsulés » en anticancéreux.</i>	3
1.1	<i>Représentation schématique de la classification IUPAC¹ des solides poreux en fonction du diamètre des pores. D'après [22].</i>	8
1.2	<i>Représentation schématique d'une molécule tensioactive.</i>	9
1.3	<i>Représentation schématique d'un tensioactif sous forme d'un cône [22].</i>	10
1.4	<i>Diagramme de phase du bromure de cetyltriméthyl ammonium, $(CH_3)(CH_2)_{15}N(CH_3)_3^+ Br^-$ ou $C_{16}TAB$ dans l'eau. D'après [46, 47].</i>	11
1.5	<i>Effet du pH sur les vitesses des réactions d'hydrolyse (H) et de dépolymérisation (D) ainsi que sur l'inverse du temps de gel (condensation, C). D'après la référence [63].</i>	13
1.6	<i>Représentation schématique des différentes interactions entre l'agent structurant et la phase inorganique. S représente l'agent structurant et I, la phase inorganique. M^+ et X^- correspondent aux contre-ions. Le solvant n'est pas indiqué à l'exception du cas S^0I^0 où il est représenté par des triangles. Les lignes en pointillés correspondent aux liaisons hydrogènes. D'après la référence [22].</i>	14
1.7	<i>Structure des matériaux de la famille M41S. (A) MCM-41, (B) MCM-48 et (C) MCM-50. D'après la référence [69].</i>	15
1.8	<i>Représentation schématique des deux mécanismes de formation des MCM-41 proposés par Beck et al. [30]. (A) Voie « True Liquide-Crystal Templating » (TLCT), (B) Voie auto-assemblage. D'après la référence [69].</i>	15
1.9	<i>Représentation schématique du mécanisme de formation impliquant une organisation coopérative proposée par Firouzi et al.. D'après la référence [22].</i>	16
1.10	<i>Représentation schématique de l'influence des paramètres de réaction sur la taille de sphères de silice préparées avec la méthode de Stöber. Inspirée de [83].</i>	18
1.11	<i>(a) Représentation schématique d'une particule sphérique constituée d'un noyau cubique de type MCM-48 et de canaux cylindriques dont la croissance s'est faite de manière épitaxiale sur les faces $\{111\}$ et $\{001\}$. (b) et (c) Projections de la particule suivant les axes $[001]$ et $[111]$ [93].</i>	19

1.12	(a) Clichés MET des nanoparticules mésoporeuses dont les mésophases sont les suivantes : a) hexagonale, b) cubique, c) vésiculaire et d) vésiculaire avec une phase désordonnée à l'intérieur de la particule. (b) Représentation schématique du réacteur utilisé pour la formation des nanosphères mésoporeuses par EISA. D'après [47]	20
1.13	Mécanisme de formation des MSNs établi par Sadisavan et al. [107].	21
1.14	Mécanisme de formation des nanoparticules mésoporeuses préparées à partir du système H_2O - CTAB - TEA - TMOS [112].	22
1.15	Représentation schématique et données caractéristiques correspondantes des déplacements chimiques en spectroscopie RMN ^{29}Si et des bandes en spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (FT-IR) des différents groupements de surface de la silice. En spectroscopie RMN ^{29}Si , les différents atomes de silicium de la silice sont désignés par la terminologie Q^n , où n représente le nombre d'oxygènes pontants liés à l'atome central de silicium.	26
1.16	Représentation schématique de la fonctionnalisation des groupements silanols par fonctionnalisation post-synthèse. Schéma inspiré de [146].	27
1.17	Représentation schématique de la fonctionnalisation par co-condensation en présence de tensioactifs. Schéma inspiré de [146].	29
1.18	Fonctionnalisation de type PMOS. Schéma inspiré de [146].	30
1.19	Diagramme d'énergie potentielle en fonction de la distance interparticulaire (a) et évolution du diagramme d'énergie potentielle lors de l'ajout de sel (b). Référence : [202, 203].	32
1.20	Représentation schématique de l'adsorption de l'eau en surface de la particule (chargée négativement), de la double couche électronique entourant la particule ainsi que de la variation du potentiel électrique et de la concentration ionique en fonction de la distance à l'interface d. ψ_0 représente le potentiel de surface, ψ_d le potentiel électrostatique au niveau du plan externe de Helmholtz (OHP), ζ le potentiel électrocinétique, κ^{-1} la longueur réciproque de Debye, C^+ et A^- les concentrations respectives en cations et en anions de la solution, C_s la concentration totale en électrolyte dans la solution. D'après la référence [207].	34
1.21	Formule du polyéthylène glycol (PEG) simple comportant deux fonctions hydroxyles en bout de chaînes. C'est un polymère composé d'un nombre donné de monomères d'éthylènes glycols.	36
1.22	Formule de la polyéthylènenimine (PEI) branchée. Ce polymère de haute densité de charges comporte des amines primaires, secondaires et tertiaires.	37
1.23	Stratégies de ciblage tumoral les plus usuelles et les plus adaptées aux applications cliniques. D'après [3].	39
1.24	Représentation schématique des quatre générations de vecteurs.	42

1.25	<i>Représentation schématique d'une nanoparticule mésoporeuse de silice considérée comme une plateforme multifonctionnelle pour la vectorisation médicamenteuse. A) contrôle du relargage par un « gardien » (CdS, Fe_3O_4), B) anticancéreux, C) groupement organique clivable (pH, enzyme...), D) polymères, E) agent d'imagerie (fluorophore, nanoparticules magnétiques, quantum dots), F) agent de ciblage, G) complexation avec l'ADN, H) agent de ciblage additionnel permettant une internalisation (peptides), I) agent de diagnostique, J) polymères sensibles à un stimulus (pH, température), K) groupements fonctionnels modifiant le métabolisme cellulaire. D'après [12].</i>	44
1.26	<i>Réactions successives d'hydrolyse et de déprotonation du CDDP en milieu aqueux ($\text{pK}_{a1} = 6,41$; $\text{pK}_{a2} = 5,37$; $\text{pK}_{a3} = 7,21$) [313]. Les espèces chargées positivement (rouge) sont très réactives.</i>	46
1.27	<i>Sites de fixation préférentiels du cisplatine sur les bases nucléiques de l'ADN [316].</i>	46
1.28	<i>Différents types d'adduits possibles après exposition de l'ADN au cisplatine. L'adduit 1,2-intrabrin (a) entre deux purines voisines est le plus fréquent. Les adduits 1,3-intrabrin (b) et interbrin (c) sont plus rares. Il existe également des pontages monofonctionnel ou bifonctionnel sur protéine non représentés ici. . . .</i>	47
1.29	<i>Les sels de platine(II) couramment utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. . .</i>	48
1.30	<i>Représentation schématique d'une nanoparticule PEGylée de LipoplatinTM. Le cisplatine est représenté par la sphère bleue. D'après [9].</i>	49
1.31	<i>Méthode de synthèse des micelles polymériques contenant le CDDP. A) Structure chimique du CDDP et B) du copolymère diblocs PEG-P(Glu), C) structure chimiques du nano-système CDDP-P(Glu)-PEG, D) libération du CDDP en milieu physiologique. D'après [334].</i>	50
1.32	<i>Méthode de synthèse des nanoparticules de copolymère à base de poly(acide lactico-glycolique) (PLGA) et de PEG. Abréviations : PSMA, antigène membranaire prostatique spécifique; EDC, (1-ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride); NHS, N-hydroxysuccinimide. D'après [254].</i>	51
1.33	<i>(a) Mécanisme de formation et mode d'action des nanocapsules, (b) test de cytotoxicité sur des cellules du carcinome ovarien humain : triangle, nanocapsules ; carré plein ou vide, cisplatine avec ou sans cycles de congélation et décongélation ; pointillés, lipides, (c) image de cryomicroscopie électronique des nanocapsules. D'après [336].</i>	51
1.34	<i>Procédures de fonctionnalisation en deux étapes des MSNs par des groupements carboxyliques. D'après [15].</i>	53
1.35	<i>Mécanisme de formation proposé pour le complexe formé entre le CDDP et les groupements carboxyliques présents en surface des canaux des MSNs. D'après [15].</i>	53

2.1	<i>Dispositif expérimental. ① Un ballon à fond rond à quatre cols avec un réfrigérant est placé dans un bain d'huile dont la température est directement contrôlée par un thermocouple. ② Si nécessaire, un flux de gaz peut être ajouté à travers le col. La température et le pH sont mesurés à travers les cols ③ et ④. Le TEOS est injecté via une seringue placée sur le col ④ et dont la vitesse d'injection est contrôlée par un pousse-seringue.</i>	57
2.2	<i>Images MET montrant l'évolution de la morphologie des matériaux obtenus en fonction de la concentration en soude. Les tailles des espaces vides ne sont données qu'à titre indicatif.</i>	59
2.3	<i>Images MET obtenues à des plus forts grossissements montrant ainsi l'évolution de la mésostructure des matériaux obtenus pour des concentrations en soude de 5, 10, 14,4 et 20 mM. Les mesures de la taille de quelques particules sont également indiquées.</i>	61
2.4	<i>(a) Diffractogrammes des poudres calcinées et synthétisées pour des concentrations en soude de 5 mM à 27,5 mM. (b) Diffractogramme de l'échantillon calciné synthétisé à une concentration en soude de 20 mM.</i>	62
2.5	<i>Diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés à des concentrations en soude de (a) 14,4 et (b) 27,5 mM. Les analyses ont été réalisées soit après synthèse, soit après calcination.</i>	62
2.6	<i>Cartographie des intensités des pics en fonction de la concentration en soude et de l'angle 2θ.</i>	63
2.7	<i>Isothermes de sorption de N_2 et distributions des pores d'après la méthode BJH pour les échantillons synthétisés avec des concentrations en soude de 5 à 27,5 mM. Symboles vides : branche d'adsorption ; Symboles pleins : branche de désorption.</i>	64
2.8	<i>Spectres RMN ^{29}Si MAS des poudres non-calcinées et synthétisées pour les concentrations en soude de : (a) 5 mM, (b) 5, 10, 14,4, 20 et 25 mM. Ceux-ci ont été réalisés sur les poudres avant calcination. La majorité des centres de silice est reliée à trois ou quatre autres tétraèdres de silice. Schéma de représentation des Q_s^i inspiré de [79]. Les conditions d'analyse sont données en Annexe E.1.</i>	67
2.9	<i>Courbe ATG et courbe dérivée de la masse de l'échantillon synthétisé à 14,4 mM. Le traitement thermique est réalisé sous flux d'air à une rampe de température de 5°C/min de 25°C à 800°C. Pour plus d'informations sur l'analyse et les caractéristiques techniques de l'appareil, se reporter à l'Annexe F.</i>	69
2.10	<i>Schéma récapitulatif des trois domaines observés lorsque la concentration en NaOH évolue de 5 mM à 27,5 mM.</i>	71
2.11	<i>(a) Diagramme de diffraction des échantillons synthétisés pour des températures de synthèse de 50°C, 70°C et 90°C, (b) Image MET de l'échantillon synthétisé à une température de 90°C.</i>	73
2.12	<i>Images MET des échantillons synthétisés à 150 et 400 rpm.</i>	74

2.13	Diagrammes de diffraction des échantillons calcinés et synthétisés pour des vitesses d'agitation de 150, 400, 550, 700 et 900 rpm.	75
2.14	Images MET des différentes « populations » observées pour l'échantillon correspondant à une vitesse d'agitation de 150 rpm. Les particules sont soit sphériques, avec des diamètres très différents, ou soit de forme coudée (« bean-like »).	76
2.15	Isotherme de sorption de N_2 et distribution de taille des pores pour l'échantillon synthétisé à une vitesse d'agitation de 150 rpm.	76
2.16	(a) Spectres Raman entre 400 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} du CTAB(s), des MSNs extraites quatre fois avec NH_4^+ , des MSNs avant extraction et des NPs Stöber calcinées (référence silice) pendant 4 heures à 550°C sous un débit d'air de $0,5\text{ L/min}$. (b) Spectres Raman entre 2800 cm^{-1} et 3000 cm^{-1} des MSNs avant extraction, du CTAB(s), des MSNs extraites quatre fois avec NH_4^+ et du TEOS(l). Les mesures sont effectuées à 25°C et prises avec un laser de longueur d'onde d'excitation de 785 nm à l'exception des mesures du spectre des NPs Stöber calcinées prises avec un laser de longueur d'onde d'excitation de 532 nm . Plus d'informations sur l'appareillage utilisé sont disponibles en Annexe F.	79
2.17	(a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction pour les échantillons fraîchement calcinés (vert) ou après 1 an à l'air ambiant (orange).	85
2.18	(a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons fraîchement extraits (vert) ou après 8 mois à l'air ambiant (orange).	85
2.19	(a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons lyophilisés avant (vert) ou après extraction (orange).	87
2.20	(a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons calcinés (vert) puis lyophilisés (orange).	87
2.21	(a) Isotherme de sorption de N_2 avec sa distribution en taille de pores et (b) diagramme de diffraction après calcination de l'échantillon synthétisé dans les conditions « standards ». La surface spécifique accessible, le volume poreux et la taille des pores valent $1075\text{ m}^2/\text{g}$, $0,95\text{ cm}^3/\text{g}$ et $2,9\text{ nm}$, respectivement. La distance de corrélation du pic le plus intense vaut $3,85\text{ nm}$ ($2\theta = 2,29^\circ$).	89
2.22	Photo du précipité obtenu après deux heures de synthèse dans le cas des conditions « standards » et évolution avec le temps du diamètre hydrodynamique après redispersion aux ultrasons. Pour la mesure, les particules sont diluées 20 fois et redispersées aux ultrasons à $t = 0\text{ min}$. L'atténuateur et la position sont maintenus fixes pour les trois mesures.	89
2.23	Images MET des particules obtenues après deux heures de synthèse dans le cas des conditions « standards ».	90

2.24	<i>Démarche expérimentale utilisée afin d'étudier l'effet de la présence des carbonates et de l'éthanol sur la synthèse des MSNs. NaOH 2 M « fraîche » : solution de soude conservée en boîte à gants, par conséquent dépourvue de carbonates. NaOH 2 M « carbonatée » : solution de soude stockée dans des conditions classiques, i. e. à l'air.</i>	91
2.25	<i>(a) Spectres Raman d'une solution aqueuse contenant 5% (v/v) d'éthanol technique et des surnageants des synthèses réalisées avec et sans flux de N₂, (b) Spectres Raman entre 600 et 1800 cm⁻¹ de solutions d'éthanol à différentes concentrations volumiques. Longueur d'onde d'excitation du laser $\lambda = 532$ nm.</i>	93
2.26	<i>Variation en fonction du pH du rapport $\alpha_n = H_{2-n}CO_3^{n-}/C_T$ avec $n = 0, 1, 2$. . .</i>	94
2.27	<i>(a) Spectres Raman d'une solution de carbonate de sodium Na₂CO₃ à 2 M et d'une solution de soude carbonatée initialement à 2 M (à l'air pendant une semaine), (b) Spectres Raman de solutions de carbonate de sodium à différentes concentrations. Longueur d'onde d'excitation du laser $\lambda = 532$ nm.</i>	95
2.28	<i>Distributions en taille DDL obtenues pour les trois expériences après synthèse. .</i>	96
2.29	<i>Images MET des échantillons obtenus pour les expériences ❶, ❷ et ❸.</i>	96
2.30	<i>(a) Diamètres hydrodynamiques des MSNs après synthèse. (b) Photos des suspensions pour le protocole « standard » (triangle noir) et le protocole « flux de N₂ » (triangle vert).</i>	98
2.31	<i>(a) Isothermes de sorption de N₂ avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction après calcination des échantillons synthétisés dans les conditions « standards » (courbe noire) ou en utilisant un flux de N₂ pendant toute la durée de synthèse (courbe verte).</i>	99
2.32	<i>Spectres RMN ²⁹Si MAS en simple impulsion des MSNs synthétisées dans les conditions « standards » ou en présence d'un flux de N₂.</i>	100
2.33	<i>(a) Isothermes de sorption de N₂ avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés sous flux de N₂ après extraction (vert) ou après 24h dans l'eau (orange).</i>	101
2.34	<i>(a) Isothermes de sorption de N₂ avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés dans les conditions « standards » après extraction (vert) ou après 24 h dans l'eau (orange).</i>	101
2.35	<i>Clichés MET des MSNs après 24 heures dans l'eau pour les échantillons synthétisés dans les conditions « standards » (a) ou pour l'échantillon synthétisé sous N₂ (b).</i>	102
2.36	<i>Démarches expérimentales utilisées pour renforcer la structure des MSNs.</i>	103
2.37	<i>Spectres RMN ²⁹Si MAS en simple impulsion des MSNs synthétisées sous flux de N₂ avec ou sans renforcement.</i>	105
2.38	<i>(a) Isothermes de sorption de N₂ avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés avec renforcement (courbes noires) ou sans renforcement (courbes vertes).</i>	105

2.39	(a) Isothermes de sorption de N_2 avec leur distribution en taille de pores et (b) diagrammes de diffraction des échantillons synthétisés sous flux de N_2 pendant 2 heures suivi d'un « renforcement » de 24 heures à $pH = 7,5$ et après extraction au nitrate d'ammonium ($4^*NH_4NO_3$). En vert : directement après extraction. En orange : après 24 heures de vieillissement dans l'eau.	107
2.40	Clichés MET des MSNs renforcées (a) après extraction et (b) après 24 heures dans l'eau.	107
2.41	Diamètres hydrodynamiques des MSNs après extraction. Sel de fond $NaCl = 10^{-3}M$, $[MSNs] = 1\text{ mg/mL}$ et $pH = 7$	108
2.42	Clichés MET après extraction des échantillons (a) issu de la méthode « standard », (b) issu de la synthèse réalisée sous flux de N_2 et renforcée.	108
2.43	Viabilité cellulaire des MSNs extraites et non extraites (a) et cytotoxicité du CTAB (b) sur des cellules cancéreuses de côlon humain SW480. La révélation est effectuée soit directement après 72 heures de traitement, soit après 3 jours de post-incubation supplémentaires.	111
3.1	Diamètres hydrodynamiques après synthèse des nanoparticules mésoporeuses de silice non fonctionnalisés $MSNs_{ext}$ (courbe noire), des $MSNs-NH_2$ (courbe bleue), des $MSNs-COOH_{sph}$ (courbe rouge), des $MSNs-SH$ (courbe orange) et des $MSNs-COOH_{rod}$ (courbe verte). Sel de fond : $NaCl\ 10^{-3}\ M$	118
3.2	Clichés MET après extraction des MSNs greffées par co-condensation.	119
3.3	Mécanisme de nucléation et croissance de particules fonctionnalisées de type MCM-41 proposé par Sadasivan et al. pour leur condition de synthèse. (a) agrégation des micelles hybrides, (b) transformation de phase, (c) co-condensation du TEOS/APTES, élongation du système tensioactif/silicate et croissance le long de la direction perpendiculaire aux canaux, (d) image MET d'une particule correspondant à (c), (e) co-condensation du TEOS/MPTES, élongation du système tensioactif/silicate et croissance le long de la direction parallèle aux canaux, (f) image MET d'une particule correspondant à (e). D'après [423].	120
3.4	Potentiel zêta des nanoparticules fonctionnalisées en fonction du pH . Les courbes servant sont de guide. Sel de fond : $[NaCl] = 10^{-2}\ M$. Les valeurs obtenues pour les $MSNs-SH$ et $MSNs-COOH_{rod}$ sont à prendre avec vigilance puisque les objets sont anisotropes.	121
3.5	Isothermes de sorption de N_2 , distributions de taille des pores et diffractogrammes des MSNs fonctionnalisés.	123

3.6	<i>Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons MSNs (noir) et MSNs-COOH_{rod} (vert). Les mesures ont été effectuées sous flux d'air reconstitué à 25 mL/min avec une rampe de montée en température de 2 °C/min. Les pertes de masse sont calculées en fonction de la masse initiale d'échantillon (a) ou en fonction de la masse à 150 °C (b).</i>	125
3.7	<i>Spectres RMN ²⁹Si MAS des particules MSNs-SH, MSNs-NH₂ et MSNs-COOH_{sph} en simple impulsion (a) et en polarisation croisée (b). Mesures réalisées sur les échantillons avant extraction.</i>	128
3.8	<i>Spectres RMN ²⁹Si MAS en polarisation croisée pour l'échantillon MSNs-SH avant extraction. On indique sur la figure le type de liaison (avec les déplacements chimiques) que peut former l'atome de silicium en fonction de son environnement.</i>	129
3.9	<i>Spectres infrarouges expérimentaux des MSNs non fonctionnalisées et mesurés à l'air ambiant (rouge), sous vide dynamique (vert) et sous vide à 87 °C (bleu).</i>	130
3.10	<i>Représentation schématique des groupements de surface des MSNs et attributions des bandes de vibration infrarouges correspondantes [154–156, 205].</i>	131
3.11	<i>Spectres infrarouges expérimentaux des MSNs-NH₂ sous air et sous vide à différentes températures. Le spectre des MSNs non fonctionnalisées sous vide à 87 °C est indiqué en noir.</i>	132
3.12	<i>Représentation de l'espèce zwitterionique sous sa forme « hydratée » (I) et sous sa forme « déshydratée » (II).</i>	133
3.13	<i>Spectres infrarouges expérimentaux des MSNs-COOH_{rod} sous air et sous vide à différentes températures. Le spectre des MSNs non fonctionnalisées sous vide à 87 °C est indiqué en noir.</i>	134
3.14	<i>Formation de l'anhydride succinique par déshydratation de l'acide dicarboxylique.</i>	135
3.15	<i>Spectres infrarouges expérimentaux des MSNs-COOH_{sph} sous air et sous vide à différentes températures. Le spectre des MSNs non fonctionnalisées sous vide à 87 °C est indiqué en noir.</i>	135
3.16	<i>Spectres Raman allant de 400 à 1550 cm⁻¹ (a) et de 2400 à 3100 cm⁻¹ (b) du précurseur MP TES, des particules non fonctionnalisées et des particules MSNs-SH avant extraction à l'HCl. Les mesures sont effectuées à 25 °C en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 532 nm.</i>	136
3.17	<i>Formule du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂.</i>	138
3.18	<i>Formule de la polyéthylènemine (PEI) branchée. Ce polymère de haute densité de charges comporte des amines primaires, secondaires et tertiaires. Les pK_a de la PEI₁₈₀₀ ont été déterminés par dosage : pK_{a1} = 10,7; pK_{a2} = 8,3 et pK_{a3} = 7,1 [459].</i>	138

3.19	<i>Schéma récapitulatif du greffage de la surface des MSNs par des acides carboxyliques. Le greffage est réalisée en très large excès de silane, à savoir 5 molécules de TESP/nm² et en considérant la surface externe égale à 100 m²/g (estimée en utilisant la méthode t-plot [460]).</i>	139
3.20	<i>Schéma récapitulatif du greffage du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ et de la PEI₁₈₀₀ en surface des MSNs-COOH_{surf} après extraction. Formules chimiques de l'EDC et de l'NHS. Les rapports molaires sont les suivants : 1COOH/5PEI₁₈₀₀ ou 5mPEG₁₀₀₀₀-NH₂/10NHS/10EDC.</i>	140
3.21	<i>Clichés MET après extraction des particules fonctionnalisées MSNs-COOH_{surf}, MSNs-PEI et MSNs-PEG.</i>	141
3.22	<i>Potentiel Zêta des nanoparticules fonctionnalisées ou non en fonction du pH. Les courbes servent de guide pour les yeux. Sel de fond : [NaCl] = 10⁻² M.</i>	142
3.23	<i>Isothermes, distributions de taille des pores et diffractogrammes des MSNs-COOH_{surf}, MSNs-PEI et MSNs-PEG.</i>	144
3.24	<i>Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons MSNs_{ext} (noir) et MSNs-COOH_{surf} (orange). Pour la détermination du taux de greffage, la température à laquelle les pertes de masse sont soustraites est 200 °C (T_{ref} sur le graphique). Les pertes de masse sont exprimées soit en fonction de la masse initiale de l'échantillon (a), soit en fonction de la masse à 200 °C (b).</i>	146
3.25	<i>Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons MSNs-COOH_{surf} (orange) et MSNs-PEI (vert). La température pour la soustraction des pertes de masse est fixée à 70 °C (T_{ref} sur le graphique). Pertes de masse exprimées en fonction de la masse initiale de l'échantillon (a) ou en fonction de la masse à 70 °C (b).</i>	147
3.26	<i>Analyses thermogravimétriques (lignes pleines) et dérivées de la masse (lignes pointillées) des échantillons MSNs-COOH_{surf} (orange) et MSNs-PEG (bleu). La température pour la soustraction des pertes de masse est fixée à 200 °C (T_{ref} sur le graphique). Pertes de masse exprimées en fonction de la masse initiale de l'échantillon (a) ou en fonction de la masse à 200 °C (b).</i>	147
3.27	<i>(a) Spectre RMN ²⁹Si MAS en polarisation croisée des particules fonctionnalisées par le TESP et (b) configurations des recouvrements possibles du silane en surface des particules. Les représentations schématiques des différentes unités T^m (liste non-exhaustive) sont indiquées. Les mesures ont été réalisées sur l'échantillon avant extraction.</i>	150
3.28	<i>Spectres infrarouges expérimentaux des particules MSNs-COOH_{surf} sous air et sous vide à différentes températures.</i>	151

3.29	<i>Spectres infrarouges expérimentaux des particules MSNs-COOH_{surf} (courbe orange) et MSNs-PEI (courbe verte) réalisés après 1 nuit sous vide dynamique et spectre d'une solution de PEI à 50% (m/m) dispersée dans du KBr (courbe noire).</i> . . .	151
3.30	<i>Spectres infrarouges expérimentaux des particules MSNs-COOH_{surf} (courbe orange) et des MSNs-PEG (courbe bleue) réalisés sous air et spectre de référence du mPEG₁₀₀₀₀-NH₂ réalisé dans du KBr (courbe noire).</i>	153
3.31	<i>Distributions en taille obtenues en diffusion de la lumière dans du NaCl à 10⁻³ M ou NaCl à 0,15 M pour les particules MSNs-PEG.</i>	154
3.32	<i>Conditions opératoires utilisées lors des tests de cytotoxicité avec les MSNs fonctionnalisées.</i>	155
3.33	<i>Cytotoxicité des MSNs fonctionnalisées évaluées sur des cellules cancéreuses de côlon humain SW480. La révélation est effectuée directement après 72 heures de traitement (a) ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires (b).</i>	155
3.34	<i>Schéma réactionnel du couplage de l'APTES sur la rhodamine B isothiocyanate donnant de la RBITC-APTES</i>	157
3.35	<i>Schéma récapitulatif du greffage de la rhodamine RBITC-APTES par co-condensation avec le TEOS. Dans l'éthanol, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la RBITC-APTES sont égales à 542 nm et 575 nm, respectivement.</i>	158
3.36	<i>Spectre UV-Visible de la RBITC-APTES, des particules seules et des particules modifiées par la rhodamine (a). Les spectres UV-Visibles ont été réalisés dans l'éthanol. Distribution de taille DDL en intensité et cliché MET des particules modifiées par la rhodamine après extraction (b). Sel de fond : NaCl 10⁻³ M.</i> . . .	158
3.37	<i>Cytotoxicité des MSNs-Rh évaluée sur des cellules cancéreuses de côlon humain SW480. La révélation est effectuée directement après 72 heures de traitement ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires.</i>	159
3.38	<i>Représentation schématique du montage utilisé pour les observations en microscopie confocale et des considérations faites pour l'interprétation des résultats.</i> .	160
3.39	<i>Visualisation en microscopie confocale de la localisation des MSNs-Rh au sein des cellules cancéreuses coliques SW480 après différents temps de traitement : 30', 2h, 4h, 8h, 20h et 32h à la concentration de 50 µg/mL. Les MSNs sont colorées en rouge et les noyaux en vert.</i>	161
4.1	<i>Spectre d'absorption UV-visible du CDDP à différentes concentrations dans l'eau : (a) 1 mg/mL ; (b) 0,05 mg/mL. Toutes les solutions ont été conservées à l'abri de la lumière.</i>	166
4.2	<i>Réactions successives d'hydrolyse et de déprotonation du CDDP en milieu aqueux (pK_{a1} = 6,41 ; pK_{a2} = 5,37 ; pK_{a3} = 7,21) [313]. Les espèces chargées positivement (très réactives) sont indiquées en rouge.</i>	167

4.3	<i>Evolution du spectre d'absorption UV-visible du CDDP dans l'eau pour des concentrations de 1 mg/mL (a) et 0,05 mg/mL (b). Toutes les solutions ont été conservées à l'abri de la lumière.</i>	168
4.4	<i>Evolution du spectre d'absorption UV-visible d'une solution de CDDP à 1 mg/mL, hydrolysée 48 heures dans l'eau, puis rediluée dans une solution de NaCl à 0,15 M. Toutes les solutions ont été conservées à l'abri de la lumière.</i>	168
4.5	<i>Réaction de complexation entre l'ortho-phénylediamine et le CDDP.</i>	169
4.6	<i>Spectres UV-visible du mélange stœchiométrique CDDP/OPDA après réaction dans le DMF à 90°C (courbe verte), de l'ortho-phénylènediamine dans l'eau (courbe rouge) et d'une suspension de MSNs dans l'eau après centrifugation (courbe bleue).</i>	169
4.7	<i>(a) Spectres UV-visible des mélanges CDDP/OPDA pour des concentrations en complexe de 27,67 μM à 0,55 μM. (b) Droite d'étalonnage et points de contrôle de la validité de la méthode.</i>	170
4.8	<i>Taux d'adsorption du platine sur les différents types de MSNs mesurés par spectrophotométrie UV-visible ou par mesure ICP-AES. Les barres d'erreurs représentent les erreurs absolues. Par spectrophotométrie, l'erreur est estimée à partir de trois mesures indépendantes de l'absorbance du pic à 705 nm. L'erreur sur les mesures ICP-AES est égale à 5%.</i>	172
4.9	<i>Mécanisme de formation du complexe formé entre le CDDP et le DMSO [498]. .</i>	175
4.10	<i>Micrographies MET et STEM-HAADF des MSNs extraites, non fonctionnalisées et encapsulées par imprégnation avec le cisplatine après évaporation du solvant à 40°C sous air et à l'abri de la lumière.</i>	176
4.11	<i>Taux de platine déterminés par ICP-AES pour l'adsorption et l'imprégnation du CDDP dans les différentes MSNs. Les barres d'erreurs représentent les erreurs absolues.</i>	177
4.12	<i>Images MEB en mode électrons retrodiffusés du CDDP seul et des échantillons encapsulés puis lavés à l'éthanol.</i>	179
4.13	<i>Spectres Raman du CDDP_(s) (a) et des particules encapsulées (b). Longueur d'onde d'excitation du laser $\lambda = 785$ nm.</i>	180
4.14	<i>Micrographies STEM-HAADF des échantillons CDDP@MSNs_{ext}, CDDP@MSNs-PEI, CDDP@MSNs-PEG et CDDP@MSNs-SH.</i>	181
4.15	<i>Images STEM-HAADF et cartographies EDS du platine pour les échantillons CDDP@MSNs-SH et CDDP@MSNs-PEI.</i>	182
4.16	<i>Profils de libération du CDDP pour les différentes MSNs fonctionnalisées ou non. (a) Profils sur toute l'échelle de temps étudié (0 - 192 heures). (b) Profils de relargage entre 8 heures et 192 heures. *Pour chaque échantillon et chaque temps, les taux de libération à 8 heures ont été soustraits.</i>	183

4.17	<i>Conditions opératoires utilisées lors des tests de cytotoxicité avec les MSNs fonctionnalisées.</i>	185
4.18	<i>Cytotoxicité des différentes MSNs encapsulées par du CDDP après 72 heures de traitement (a) et après 3 jours de post-incubation supplémentaires (b).</i>	185
4.19	<i>Cytotoxicité des différentes MSNs après 72 heures de traitement (a) ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires (b) exprimées en fonction de la concentration initiale de CDDP dans les différentes MSNs.</i>	186
4.20	<i>Évolution de la cytotoxicité prise à 200 µg/mL pour les différentes MSNs encapsulées en fonction (a) de la concentration en CDDP libre à 72 heures et (b) du taux de libération après 72 heures.</i>	187
A-1	<i>Classification de l'IUPAC des isothermes d'adsorption physique. D'après [21]. .</i>	195
A-2	<i>Isotherme d'adsorption/désorption d'azote caractéristique des MSNs de type MCM-41. Déterminée pour un échantillon calciné. Isotherme de type IV selon la classification de l'IUPAC.</i>	196
B-3	<i>Diffraction des rayons X sur deux plans réticulaires.</i>	199
B-4	<i>Diffractomètre Bruker® D8 Advance équipé d'un PSD linéaire de type Vantec. .</i>	200
B-5	<i>Diffractogramme caractéristique d'un matériau mésoporeux de type MCM-41 (a) et représentation schématique de l'arrangement hexagonal des pores (b) avec \mathbf{a}_0 : paramètre de maille, \mathbf{e} : épaisseur des parois, \mathbf{D}_p : diamètre des pores et \mathbf{d}_{hkl} : distance inter-réticulaire entre les plans de diffraction.</i>	200
C-6	<i>Fonction de corrélation de particules en fonction du temps de corrélation. . . .</i>	202
E-7	<i>Schéma de principe d'une sonde MAS. D'après [510].</i>	204
E-8	<i>Schéma (a) et photographies (b) du dispositif expérimental de mesure par spectroscopie infrarouge. 1) fenêtre en KBr, 2) joint en indium, 3) porte-échantillon, 4) tige mobile, 5) manipulateur magnétique, 6) échantillon sous forme de pastille, 7) four, 8) thermocouple, 9) entrée du gaz, 10) capteur de pression, 11) ligne de vide, 12) flux d'azote, 13) vanne d'évacuation. D'après [438].</i>	206

Liste des tableaux

1.1	<i>Morphologie des agrégats en fonction de la valeur du paramètre d'empilement g du tensioactif.</i>	10
1.2	<i>Tableau récapitulatif des méthodes de synthèse menant à des MSNs.</i>	24
1.3	<i>Concentrations ioniques du plasma sanguin humain. D'après [197].</i>	30
1.4	<i>Vecteurs existants utilisés pour la délivrance médicamenteuse.</i>	38
1.5	<i>Caractéristiques physico-chimiques du cisplatine.</i>	45
2.1	<i>Données récapitulatives des valeurs de pH et de température relevées avant l'ajout du TEOS pour les différentes concentrations en soude étudiées. Les données expérimentales de la synthèse « standard » sont données en rouge.</i>	57
2.2	<i>Propriétés morphologiques des matériaux obtenus pour des concentrations initiales en NaOH de 5,0 à 27,5 mM. ^ad_{DDL} : Diamètre hydrodynamique des particules déterminé par DDL à partir de la méthode des cumulants (taille moyenne harmonique pondérée en intensité, voir Annexe C). Le diamètre est la moyenne des valeurs obtenues pour trois mesures; ^bPDI : Indice de PolyDispersité (PDI); ^cd_{TEM} : Taille moyenne en intensité des particules obtenues par comptage MET ($\sum d_i^6 / \sum d_i^5$). Pour chaque échantillon, 70 comptages ont été réalisés; ^dc_v : Coefficient défini par $c_v = \sigma / d_{MET}$ où σ est l'écart type de la distribution en taille. Les particules sont monodisperses si $c_v = 0$; ND : Non Déterminé à cause de la sédimentation des particules.</i>	60
2.3	<i>Tableau récapitulatif des paramètres structuraux des matériaux synthétisés pour des concentrations en soude de 5 à 27,5 mM.</i>	63
2.4	<i>Caractéristiques porales et surfaces spécifiques des matériaux obtenus pour des concentrations en soude de 5,0 mM à 27,5 mM. ^aS_{BET} : Surface spécifique accessible Brunauer-Emmet-Teller (BET); ^bV_t : Volume adsorbé total calculé au niveau du dernier point de mesure de la branche d'adsorption; ^cV_m : Volume mésoporeux calculé à une pression relative $P/P_0 \leq 0,75$; ^dD_p : Diamètre des pores obtenu par la méthode de Barret-Joyner-Halenda (BJH) et calculé sur la branche de désorption.</i>	65

2.5	Tableau récapitulatif des distances de corrélation avant (d_{synth}) et après calcination (d_{calc}) correspondant au plan (100) et intensités relatives des contributions caractéristiques du silicium. Les surfaces ont été déterminées par déconvolution des différentes contributions. Degré de condensation D_{cond} et taux de contraction P_{cont} (%) du réseau de silice pour des concentrations en soude croissantes et quantité de groupements silanols (SiOH) par rapport à la quantité totale de silicium Si. En rouge, la synthèse « standard ». Erreurs estimées sur Q^2 , Q^3 et Q^4 : 5%. Les décompositions des spectres RMN ont été effectuées avec le logiciel DMfit [357].	68
2.6	Rapport molaire $\text{SiO}_2/\text{CTA}^+$ pour les échantillons synthétisés à des concentrations en soude 5, 10, 14,4, 20 et 25 mM.	70
2.7	Propriétés morphologiques, structurales et texturales des MSNs synthétisées à différentes températures pour une vitesse d'agitation de 700 rpm et des rapports molaires constants égales à 0,32NaOH/1TEOS/0,127CTAB/1235H ₂ O.	72
2.8	Propriétés morphologiques, structurales et texturales des MSNs synthétisées à différentes vitesses d'agitation pour une température et des rapports molaires constants : 70 °C et 0,32NaOH/1TEOS/0,127CTAB/1235H ₂ O, respectivement.	74
2.9	Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des MSNs obtenues après différents modes d'extraction. Les intensités sont obtenues après avoir réalisé un fit linéaire afin de s'affranchir du bruit de fond.	81
2.10	Propriétés structurales et texturales des MSNs fraîchement extraites ou vieilles à l'air ambiant.	86
2.11	Propriétés structurales et texturales des MSNs ayant subi une lyophilisation avant extraction, après extraction ou après calcination. Celles-ci sont comparées aux propriétés structurales des particules ayant subi une extraction ou une calcination. La surgélation est réalisée dans l'azote liquide (77K). L'élimination du solvant a lieu à une température de 193 K et une pression de 10 μbar	87
2.12	Récapitulatif des propriétés physico-chimiques des différents matériaux obtenus pour les synthèses réalisées soit dans les conditions « standards », soit en présence d'un flux de N ₂	98
2.13	Propriétés physico-chimiques des MSNs après extraction (4*NH ₄ NO ₃ /éthanol) et après 24 h de vieillissement dans l'eau.	101
2.14	Propriétés physico-chimiques des MSNs synthétisées sous flux de N ₂ avec ou sans renforcement (Renf. ou Ss renf., respectivement) à pH = 7,5 pendant 24 heures ou dans les conditions « standards » (Std.). Les tailles d_{DDL} et d_{MET} sont données après synthèse.	104

2.15	Récapitulatif des propriétés structurales des MSNs renforcées après extraction (Ext.) et après 24 heures de vieillissement dans l'eau (Ext. 24 h). L'extraction du tensioactif a été réalisée en utilisant la méthode au nitrate d'ammonium (voir paragraphe 2.1.5.4).	106
3.1	Récapitulatif des silanes secondaires (Fluorochem, UK) utilisés pour la fonctionnalisation des différents types de MSNs.	116
3.2	Récapitulatif des quantités de matière ajoutées lors de la fonctionnalisation par co-condensation des MSNs par des fonctions amines, thiols et carboxyliques. La quantité molaire de TESP est de 5% au lieu de 10% étant donné que la molécule possède deux fonctions carboxyliques pour un silane.	117
3.3	Diamètres hydrodynamiques moyens obtenus après synthèse ($d_{DDL\ synth.}$) ou après extraction ($d_{DDL\ ext.}$) et diamètres obtenus par comptage MET ($d_{MET\ ext.}$) des MSNs fonctionnalisées après extraction.	119
3.4	Caractéristiques structurales et texturales des particules fonctionnalisées ou non.	124
3.5	Tableau récapitulatif des résultats obtenus par ATG et AE. Les taux de greffage sont exprimés par rapport à la masse d'échantillon fonctionnalisé. Rappel : $\Delta m_1 = 8,5\%$.	127
3.6	Pourcentages respectifs des espèces Q^n et T^m des particules MSNs, MSNs-SH, MSNs-COOH _{sph} et MSNs-NH ₂ . Le pourcentage d'erreur sur la détermination des contributions est d'environ 5%.	129
3.7	Bandes de vibrations observées pour les MSNs fonctionnalisées avec l'APTES.	132
3.8	Bandes de vibrations observées pour le MPTES, les particules non fonctionnalisées et les MSNs-SH.	137
3.9	Diamètres hydrodynamiques moyens (d_{DDL}) et tailles obtenues par comptage MET ($d_{MET\ ext.}$) des particules fonctionnalisées avec le TESP, le PEG et la PEI. Sel de fond : NaCl 10^{-3} M.	141
3.10	Propriétés structurales et texturales des particules MSNs _{ext} , MSNs-COOH _{surf} , MSNs-PEG et MSNs-PEI. La surface spécifique et le volume poreux sont donnés en fonction de la masse totale d'échantillon.	145
3.11	Tableau récapitulatif des résultats obtenus par AE et ATG. Pour le PEG et la PEI, les masses molaires des greffons sont considérées comme étant celle des masses molaires des produits brutes. Les surfaces spécifiques considérées afin d'exprimer les taux de greffage en molécules/nm ² correspondent à la surface externe pour les particules MSNs-PEI et MSNs-PEG (100 m ² /g) et à la surface spécifique d'un échantillon non fonctionnalisé après 24 heures d'extraction soxhlet pour les MSNs-COOH _{surf} . ^a T _{ref.} : température de départ pour la détermination des pertes de masse Δm .	148

3.12	<i>Pourcentages respectifs des espèces Q^n et T^m des particules MSNs-COOH_{surf}. Les décompositions des spectres RMN réalisées dans le but de déterminer la proportion des espèces ont été effectuées avec le logiciel DMfit [357]. Le pourcentage d'erreur est d'environ 5%. Les positions sont déterminées à partir du spectre réalisé en polarisation croisée.</i>	150
4.1	<i>Solubilités apparentes du cisplatine dans différents solvants à 25 °C [312], températures d'ébullition à pression normale (T°-ébullition) et pressions de vapeur saturante des solvants (P_{sat}).</i>	175
4.2	<i>Caractérisation de l'homogénéité de la distribution du platine au sein des particules par la détermination des rapports atomiques Pt/Si de manière « globale » et de manière « locale ».</i>	178
4.3	<i>Valeurs des IC_{50} pour les différentes MSNs « chargées » après 72 heures de traitement ou après 3 jours de post-incubation supplémentaires.</i>	185
C-4	<i>Définition des distributions en taille.</i>	203
E-5	<i>Conditions d'enregistrement des spectres RMN.</i>	205
E-6	<i>Q^n (%) déterminé pour un échantillon après synthèse analysé pour deux délais de recyclage.</i>	205